

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

**PRIORITY**

**DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

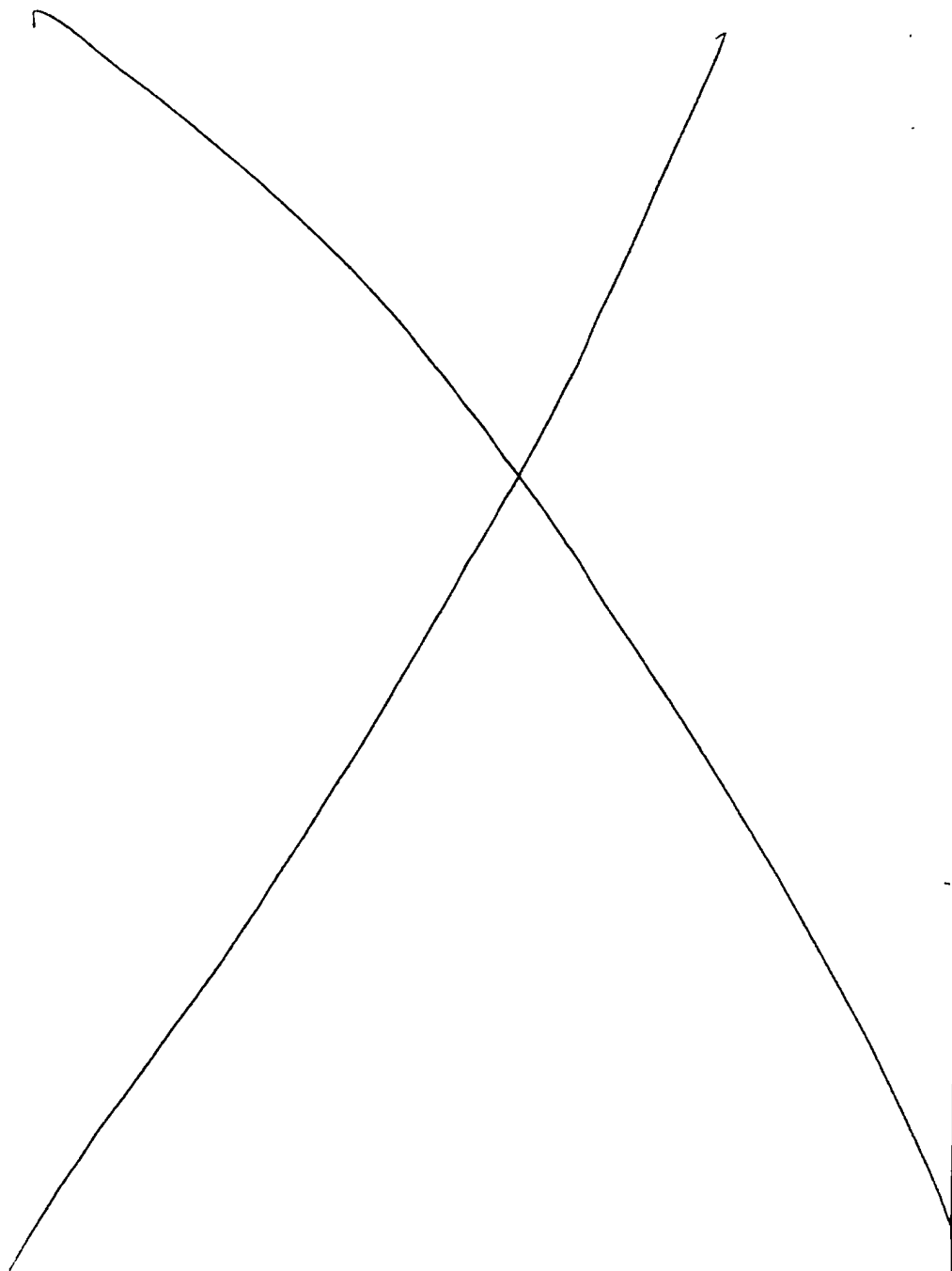
10 FEV. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cedex 08  
Telephone : 01 53 04 53 04  
Telecopie : 01 42 93 59 30





# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remettre à l'ordre dans un dossier capital

<b>DATE DE REMISE DES PIÈCES</b> 9.12.1998 <b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b> 98 15545 <b>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT</b> K <b>DATE DE DÉPÔT</b> 09 DEC. 1998		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>CABINET BEAU DE LOMENIE</b> 158, rue de l'Université 75340 PARIS CEDEX 07  <b>n° du pouvoir permanent</b> E50765/38FRA/MLG <b>références du correspondant</b> 01.44.18.89.00. <b>date</b>	
<b>2 DEMANDE</b> Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° <b>Établissement du rapport de recherche</b> <input checked="" type="checkbox"/> différé <input type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non <b>Titre de l'invention</b> (200 caractères maximum)  "Protéine humaine $\beta$ -TrCP de ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome".			
<b>3 DEMANDEUR (S)</b> n° SIREN Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination  <b>INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE</b>  Nationalité (s) <b>FRANÇAISE</b> Adresse (s) complète (s)  101, rue de Tolbiac 75654 PARIS CEDEX 13		<b>Forme juridique</b>  <b>Etablissement Public</b>  <b>Pays</b>  <b>FR</b>	
<b>4 INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
<b>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission			
<b>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</b> pays d'origine : <b>FR</b> numéro : <b>98 01100</b> date de dépôt : <b>30.01.1998</b> nature de la demande : <b>BREVET</b>  "Priorité interne" selon l'Article L 612.3 du Code de la Propriété Intellectuelle du 01/07/1992			
<b>7 DIVISIONS</b> antérieures à la présente demande n° date n° date			
<b>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (nom et qualité du signataire) <b>Marie-Louise GILLARD</b> CPI N° 92-1099		<b>SIGNATURE DU PREPOSÉ À LA RÉCEPTION</b> <b>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</b>	



# BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

## DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR (si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

### DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 15 545

### TITRE DE L'INVENTION :

Protéine humaine  $\beta$ -TrCP de ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome

### LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

Cabinet BEAU de LOMENIE  
158 rue de l'Université  
75340 PARIS CEDEX 07(FRANCE)

### DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

1/ BENAROUS Richard  
19 rue Croulebarbe  
75013 PARIS

6/ CONCORDET Jean-Paul  
41 rue de Montreuil  
94300 VINCENNES

2/ MARGOTTIN Florence  
30 rue de Lourmel  
75015 PARIS

3/ DURAND Hervé  
20 ter rue Damalouise  
91850 BOURAY/JUINE

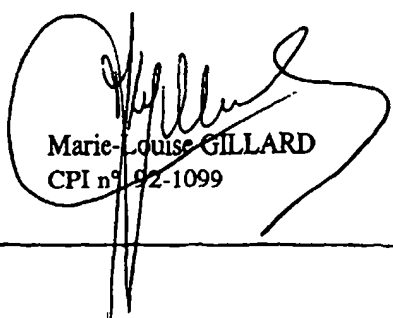
4/ ARENZANA SEISDEDOS Fernando  
18 rue de Rushmoor  
92190 MEUDON

5/ KROLL Mathias  
22 rue Labrouste  
75015 PARIS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société dépositante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

2 8 JAN. 1999

  
Marie-Louise GILLARD  
CPI n° 92-1099

La présente invention a pour objet une nouvelle protéine humaine qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome.

La dégradation des protéines par le protéasome, organite présent dans  
 5 les cellules, est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires essentiels  
 comme le contrôle de la prolifération cellulaire, le renouvellement des protéines et  
 l'élimination des protéines incorrectement repliées, en particulier au niveau du  
 réticulum endoplasmique (CIECHANOVER, A., Cell, 79, 13-21, 1994). De  
 nombreux virus, comme le virus HIV-1 qui dégrade CD4 par l'intermédiaire d'une  
 10 de ses protéines Vpu (TRONO D., Cell, 82, 189-1992, 1995), utilisent à leur profit  
 ces voies cellulaires de dégradation des protéines, dans lesquelles les protéines  
 sont ciblées par des interactions diverses avec d'autres protéines vers le  
 protéasome avant d'être dégradées. Ces voies cellulaires de dégradation des  
 protéines font généralement appel à deux étapes essentielles : la phosphorylation  
 15 et l'ubiquitinylation des protéines qui sont essentielles pour le ciblage des  
 protéines vers le protéasome.

On connaît déjà des protéines de type  $\beta$ TrCP :

- la protéine  $\beta$ TrCP de Xenope décrite par Spevak et al. (Mol. Cell. Biol., 13, 4953-4966, 1993) ;
- 20 - la protéine Slimb de la drosophile décrite par Jiang et al. (Nature, vol. 391, 29 Janvier 1998) ;
- la protéine KIAA0696 mise en évidence par Ishikawa et al. (DNA Research, 5, 169-176, 1998) à l'occasion d'une analyse systématique de séquences exprimées dans le cerveau.
- 25 Jiang et al. ont montré que la protéine Slimb est impliquée dans la stabilité de la protéine Armadillo et la signalisation de deux voies métaboliques essentielles pour le développement, à savoir les voies Hedgehog et Wingless. Ils ont également montré que la protéine Slimb a une homologie de 80% environ avec la protéine  $\beta$ TrCP de Xenope dont aucune fonction n'a été décrite par Spevak et al.
- 30 Comme la  $\beta$ -caténine chez Xenope ou chez l'homme, qui est l'homologue de la protéine Armadillo, semble être ciblée vers les voies de dégradation du

protéasome en l'absence de signalisation des voies Hedgehog et Wingless, ils suggèrent que chez l'homme, les gènes codant pour les homologues de Slimb pourraient être impliqués dans la dégradation protéolytique de la  $\beta$ -caténine oncogène.

5           Toutefois, même si la conservation des voies Wingless et Hedgehog chez les vertébrés est importante, il n'est pas pour autant certain que la conservation des fonctions des protéines homologues sera totale. Il y a d'ailleurs de nombreux exemples qui montrent qu'il y a toujours des différences significatives entre espèces.

10           La protéine selon l'invention, dénommée h- $\beta$ TrCP, est capable d'interagir avec les protéines virales ou les protéines cellulaires susceptibles d'être dégradées par le protéasome. En particulier, la protéine h- $\beta$ TrCP est capable d'interagir, notamment avec la protéine Vpu du virus HIV-1, ainsi qu'avec les protéines cellulaires I $\kappa$ B et  $\beta$ -caténine.

15           Elle est particulièrement utile pour le criblage d'agents thérapeutiques, tels que notamment des agents antitumoraux, antiviraux, anti-inflammatoires et anti-Alzheimer.

          La protéine Vpu est une petite protéine membranaire de 81 acides aminés, exprimée par la plupart des isolats du virus HIV-1 mais ni par ceux du virus humain HIV-2 nettement moins pathogène, ni par ceux du virus simien SIV (COHEN et al., Nature, 334, 532-534, 1988; et STREBEL et al., Science, 2, 1221-1223, 1988).

20           Une des fonctions de la protéine Vpu est sa capacité à induire la dégradation de la protéine CD4, récepteur cellulaire du virus HIV-1, participant ainsi à la diminution de l'expression du récepteur CD4 à la surface des cellules (Willey et al., J. Virol. 68, 1207-1212, 1994).

          On sait également que les deux sérines de phosphorylation de la protéine Vpu, situées en position 52 et 56, sont indispensables pour la dégradation de CD4 induite par Vpu (MARGOTTIN et al., Virology, 223, 381-386, 1996). En  
30    outre, lors du processus d'infection par le virus HIV-1, en l'absence de la protéine Vpu, le précurseur d'envel ppe Gp160 et la protéin CD4 nouvellement

synthétisée s'associent dans le réticulum endoplasmique, bloquant la maturation de la protéine Gp160 (BOUR et al., J. Virol., 65, 6387-6396, 1991). La dégradation du récepteur CD4 médiée par la protéine Vpu est essentielle pour libérer la protéine d'enveloppe virale qui est retenue dans le réticulum endoplasmique par sa  
 5 liaison à CD4 grâce à l'interaction avec la sous-unité Gp120, et permettre la maturation normale de l'enveloppe vers la membrane plasmique et ultérieurement son intégration dans les particules virales, ce qui les rend infectieuses. Des études récentes ont mis en évidence le fait que la dégradation du récepteur CD4 médiée par la protéine Vpu est sensible aux inhibiteurs spécifiques du protéasome,  
 10 organite présent dans la cellule, et est dépendante de la présence d'une "machinerie d'ubiquitinylation intacte" (FUJITA et al., J. Gen. Virol., 78, 619-625, 1997).

Ainsi, la protéine Vpu participe à des fonctions absolument critiques pour assurer la production de particules virales infectieuses en grand nombre, puisqu'elle intervient non seulement sur les produits du gène *gag*, c'est-à-dire sur  
 15 les protéines de structure en augmentant le relâchement des particules virales mais aussi sur ceux du gène *env* en permettant la maturation de la protéine d'enveloppe suite à la dégradation du récepteur CD4. MARGOTTIN et al. 1996 (*supra*) ont montré que l'interaction entre Vpu et CD4 se faisait par l'intermédiaire de leur domaine cytoplasmique et que cette interaction n'était pas suffisante pour  
 20 déclencher la dégradation du récepteur CD4.

La protéine Skp1p est une protéine cellulaire impliquée dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome, lequel dépend de l'ubiquitinylation des protéines (PICKART C.M., The FASEB Journal, 11, 1055-1066, 1997).

25 BAI et al. (Cell, 86, 263-274, 1996) ont montré que la protéine Skp1p était nécessaire pour la protéolyse médiée par l'ubiquitine et que cette dégradation se faisait grâce à l'interaction de Skp1p avec des protéines contenant un motif dénommé boîte F.

La protéine Skp1p est un facteur essentiel de ciblage de protéines  
 30 régulatrices du cycle cellulaire par le protéasome. Le ciblage de la dégradation de ces régulateurs est en particulier nécessaire à l'entrée du cycle cellulaire en phase

S de synthèse d'ADN (PAGANO, M., The FASEB Journal, 11, 1068-1075, 1997). Des études récentes ont montré que la protéine Skp1p, avec des protéines à boîte F sont les éléments essentiels de complexes de haut poids moléculaires appelés SCF pour "Skp1p-Cullin-F-box-protein complexes". Ces complexes SCF jouent le rôle  
 5 d'enzyme E3 qui par leur activité ubiquitine-ligase permettent la dernière étape de l'ubiquitylation de protéines substrats qui sont ainsi ciblées vers la dégradation par le protéasome (HOYT, A, Cell, 91, 149-151, 1997). Par ailleurs, on notera qu'il n'existe pas d'homologue de Skp1p chez la drosophile.

La protéine I $\kappa$ B, qui existe sous différentes formes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ), est  
 10 l'inhibiteur majeur du facteur de transcription NF $\kappa$ B, qui maintient celui-ci sous la forme d'un complexe inactif dans le cytoplasme (Beg A. et al. Genes and Dev., 7, 2064-2070, 1993). Après stimulation des cellules par des facteurs tels que l'interleukine 1 (IL1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF), la protéine I $\kappa$ B est phosphorylée sur les résidus sérine S32 et S36. Cette phosphorylation conduit très  
 15 rapidement à l'ubiquitylation de la protéine et à son ciblage vers la dégradation par le protéasome. Le facteur NF $\kappa$ B actif, par exemple sous la forme de deux sous-unités P50 et P65, est alors libéré, importé dans le noyau où il va pouvoir activer de très nombreux gènes et entraîner notamment des phénomènes inflammatoires.

20 La protéine  $\beta$ -caténine est une protéine cellulaire qui contrôle les voies essentielles de transduction de signaux, comme les voies Wingless et Hedgehog, qui sont très conservées chez tous les vertébrés. (Miller et al. Genes and Dev. 10, 2527-2539, 1996 et Polakis P. Biochim. Biophys. Acta 1332, F 127-47, 1997).

La  $\beta$ -caténine s'accumule dans les cellules cancéreuses, soit par suite de  
 25 mutations qui empêchent la phosphorylation sur les résidus sérine 33 et 37 (protéines  $\beta$ -caténines mutées), soit par suite de mutations de son co-facteur, la protéine APC, qui est nécessaire à sa dégradation.

Il a été montré récemment que des mutations de la preseniline-1 chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer entraînaient une déstabilisation et  
 30 une dégradation accrue de la  $\beta$ -caténine (Zhang et al., Nature, 395, 698-702,



1998). Ces auteurs ont montré que la preseniline-1 non mutée se lie à la  $\beta$ -caténine et contribue ainsi à sa stabilité. Dans la maladie d'Alzheimer, la preseniline mutée n'est plus capable de se lier à la  $\beta$ -caténine, et cette dernière est alors dégradée plus rapidement. Le niveau de  $\beta$ -caténine est nettement diminué  
 5 dans les cellules neuronales de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La perte de la  $\beta$ -caténine entraîne une apoptose accrue des cellules neuronales qui serait responsable de la perte neuronale constatée dans cette pathologie.

On comprend aisément qu'il est urgent de trouver des moyens pour moduler, à savoir activer ou inhiber, le ciblage des protéines vers le protéasome.

10 On a maintenant trouvé une nouvelle protéine humaine qui est une protéine qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome et qui permet de cribler des agents modulateurs du ciblage des protéines vers le protéasome.

La présente invention a donc pour objet une nouvelle protéine  
 15 humaine, dénommée h- $\beta$ TrCP, qui présente la SEQ ID No.2 et qui intervient dans le ciblage des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome.

La protéine h- $\beta$ TrCP possède 569 acides aminés et comporte une boîte F et sept motifs WD dont la position dans la séquence SEQ ID N° 2 est la suivante :

- 20 - boîte F : acides aminés 147-191,
- premier motif WD : acides aminés 259-292,
- deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
- troisième motif WD : acides aminés 343-372,
- quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
- 25 - cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
- sixième motif WD : acides aminés 467-492,
- septième motif WD : acides aminés 516-544.

En raison de l'homologie de cette nouvelle protéine avec la  $\beta$ TrCP de Xenope, protéine contenant des motifs  $\beta$ -transducine et connue en langue anglaise

sous la dénomination " beta transducin repeats containing protein", la protéine de l'invention est dénommée h- $\beta$ TrCP (human- $\beta$ TrCP).

La protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention est capable d'interagir, par l'intermédiaire de ses motifs WD, avec les protéines susceptibles d'être dégradées  
5 par le protéasome, en particulier avec les protéines virales et les protéines cellulaires qui possèdent le motif d'acides aminés Asp-Ser-Gly-Xaa-Xaa-Ser dans lequel Xaa est un acide aminé naturel quelconque.

Parmi ces protéines, on peut citer notamment la protéine virale Vpu et les protéines cellulaires I $\kappa$ B et  $\beta$ -caténine.

10 On a aussi trouvé que la protéine h- $\beta$ TrCP interagit, par l'intermédiaire de sa boîte F, avec la protéine Skp1p ; elle fait donc partie d'un nouveau complexe SCF, SCF-h- $\beta$ TrCP, qui sélectionne certaines protéines cellulaires ou virales qui doivent être dégradées par le protéasome.

Par l'activité de ciblage vers les voies de dégradation par le  
15 protéasome, la protéine h- $\beta$ TrCP, selon l'invention, joue le rôle de médiateur cellulaire de la protéine Vpu dans les cellules infectées par le virus HIV-1.

Sans pour autant vouloir se limiter à une théorie quelconque, on pense que, dans les cellules infectées par le virus HIV-1, le virus utilise, par l'intermédiaire de la protéine Vpu, le complexe SCF, dont la protéine  $\beta$ TrCP fait partie pour induire  
20 la dégradation du récepteur CD4 qui va favoriser la réplication virale et le relâchement des virions infectieux.

L'invention a aussi pour objet les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, lesdits fragments peptidiques ayant conservé l'activité  
25 d'interaction avec les protéines susceptibles d'être dégradées par le protéasome, en particulier avec la protéine Vpu du virus HIV-1, avec la protéine cellulaire I $\kappa$ B ou la protéine cellulaire  $\beta$ -caténine et/ou avec la protéine Skp1p.

L'invention concerne en particulier les fragments peptidiques qui comprennent au moins l'une des séquences en acides aminés de h- $\beta$ TrCP  
30 ci-après :

251-569,  
 292-569,  
 292-396,  
 292-545 et  
 1-291.

5

On préfère tout particulièrement les fragments peptidiques dénués en partie ou en totalité de la boîte F ou ceux qui sont dénués en partie ou en totalité des motifs WD.

Un fragment peptidique particulièrement préféré est le mutant délété des résidus 32-179, dénommé ci-après  $\beta$ TrCP $\Delta$ F.

10

La présente invention a également pour objet les séquences d'acides nucléiques, à savoir les séquences d'ADN génomique, les séquences d'ADNc ou d'ARNm qui comprennent ou sont constituées par un enchainement de nucléotides codant pour la protéine h- $\beta$ TrCP ou pour l'un quelconque de ses fragments peptidiques tels que définis précédemment.

15

L'invention concerne notamment les séquences d'acides nucléiques codant pour la protéine h- $\beta$ TrCP et ses fragments peptidiques décrits ci-dessus qui sont représentées par :

- a) les séquences d'ADNc SEQ ID No.1 codant pour ladite protéine h- $\beta$ TrCP et des fragments d'acides nucléiques codant pour lesdits fragments peptidiques ;
- b) les séquences d'ADN hybridant dans des conditions strictes avec les séquences ci-dessus ;
- c) les séquences d'ADN qui, en raison de la dégénérescence du code génétique, résultent des séquences a) et b) ci-dessus et codent pour la protéine h- $\beta$ TrCP ou ses fragments ; et
- d) les séquences d'ARNm et d'ADN correspondantes.

25

Les protéines et fragments peptidiques selon l'invention peuvent être obtenus par la technique du génie génétique qui comprend les étapes de :

- culture d'un microorganisme transformé ou de cellules eucaryotes transformées à l'aide d'une séquence d'acides nucléiques selon l'invention et

30

-récupération de la protéine ou du fragment peptidique produit par ledit microorganisme ou lesdites cellules eucaryotes.

Cette technique est bien connue de l'homme du métier. Pour plus de détail la concernant, on pourra se référer à l'ouvrage ci-après : Recombinant DNA Technology I, Editors Ales Prokop, Raskesh K Bajpai ; Annals of the New-York Academy of Sciences, volume 646, 1991.

Ils peuvent également être préparés par les synthèses peptidiques classiques bien connues de l'homme du métier.

Les acides nucléiques selon l'invention peuvent être préparés par synthèse chimique et génie génétique en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier et décrites par exemple dans SAMBROOK et al. (*supra*).

Par exemple, la synthèse des séquences d'ADNc selon l'invention peut être effectuée par amplification des ARNm de cellules humaines à l'aide de la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction), comme décrit par exemple par GOBLET et al. (Nucleic Acid Research, 17, 2144, 1989) en utilisant des oligonucléotides synthétiques comme amorces, définis à partir de la séquence d'ADN SEQ ID No.1.

Le fragment d'acides nucléiques amplifié peut ensuite être cloné selon les techniques décrites dans AUSUBEL et al. (Current Protocols in Molecular Biology, chapter 3, *supra*).

L'invention a également pour objet des animaux transgéniques exprimant un transgène de la protéine h-βTrCP de l'invention ou des animaux transgéniques dans lesquels le gène βTrCP a été invalidé.

Ces animaux transgéniques ou invalidés pour le gène de la protéine h-βTrCP pourront servir de modèles d'étude *in vivo* de la perturbation du cycle cellulaire et de la prolifération par l'absence ou la surexpression du gène de la protéine h-βTrCP ou de formes tronquées ou mutées de cette protéine, de la protéine Skp1p, de la protéine Vpu, de la protéine IκB ou de la protéine β-caténine.

Ces animaux transgéniques sont obtenus par des techniques bien connues de l'homme du métier, telles que celles décrites dans Manipulating the

mouse embryo: a laboratory manual. HOGAN, B., BEDDINGTON, R., COSTANTINI, F. & LACY, E. Cold Spring Harbor laboratory press, second edition, 1994.

5 A titre d'animaux, on préfère les mammifères tels que la souris ou le rat.

L'invention a également pour objet les microorganismes procaryotes et les cellules eucaryotes transformés à l'aide d'un vecteur d'expression contenant une séquence d'ADN selon l'invention. Ce vecteur d'expression, qui peut être par exemple sous la forme d'un plasmide, doit comporter, outre la séquence d'ADN de  
10 l'invention, les moyens nécessaires à son expression, tels que notamment un promoteur, un terminateur de transcription, une origine de réplication et de préférence un marqueur de sélection. La transformation des microorganismes et des cellules eucaryotes est une technique bien connue de l'homme du métier qui pourra aisément déterminer, en fonction du microorganisme à transformer, les  
15 moyens nécessaires à l'expression de la séquence d'ADN selon l'invention.

Le microorganisme préféré aux fins de l'invention est *E. coli* alors qu'on utilise de préférence *Saccharomyces cerevisiae* comme levure.

A titre d'exemples de cellules eucaryotes qui conviennent aux fins de l'invention, on peut citer notamment les cellules COS, CHO, SF9, Jurkat, etc.,  
20 toutes étant répertoriées à l'ATCC.

L'invention a également pour objet les cellules eucaryotes co-transformées avec des vecteurs d'expression contenant d'une part la séquence d'ADN codant pour la protéine Vpu, pour la protéine Skp1p, pour la protéine IxB ou pour les protéines  $\beta$ -caténine mutées, et d'autre part une séquence codant pour  
25 la protéine h- $\beta$ TrCP, lesdits vecteurs d'expression contenant de plus des moyens utiles à leur expression, y compris dans le système double hybride en levure.

La présente invention a donc également pour objet les agents antiviraux anti-HIV-1 qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention qui ont conservé les propriétés d'interaction de la  
30 protéine h- $\beta$ TrCP soit avec la protéine Vpu, soit avec la protéine Skp1p. Ces fragments peptidiques sont dénués de la boîte F ou des motifs WD de sorte qu'ils

ne peuvent plus interagir avec la protéine Skp1p ou la protéine Vpu, respectivement.

On peut encore citer, à titre d'agents antiviraux, d'agents antitumoraux ou d'agents anti-inflammatoires, des anticorps dirigés contre la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention et ses fragments peptidiques, ce qui constitue un autre objet de l'invention.

Ces anticorps peuvent être des anticorps monoclonaux obtenus par le procédé bien connu de KOHLER et MILSTEIN (Nature, 256, 495-497, 1975) ou des anticorps polyclonaux obtenus selon les procédés classiques d'immunisation d'animaux (Antibodies, a laboratory manual. E. Harlow & D. Lane. Cold Spring Harbor laboratory press, 1988).

On peut enfin citer comme agents antiviraux, agents antitumoraux ou agents anti-inflammatoires, les oligonucléotides antisens bloquant la transcription ou la traduction de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention qui s'hybrident avec une séquence d'acides nucléiques telle que définie précédemment, ce qui constitue également un autre objet de la présente invention.

Ces oligonucléotides antisens sont préparés par des techniques bien connues de l'homme du métier, telles que celles décrites par AUSUBEL et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New-York, 1989, Mises à jour jusqu'en 1997).

Les fragments peptidiques de h- $\beta$ TrCP, qui possèdent la boîte F ou qui ont conservé à la fois les motifs WD et la boîte F, peuvent être utilisés comme agents antitumoraux ou anti-inflammatoires.

Les fragments peptidiques de h- $\beta$ TrCP, qui sont dépourvus de la boîte F, peuvent être utilisés en thérapie génique pour le traitement des maladies inflammatoires ostéo-articulaires ou des syndromes inflammatoires aigus qui s'accompagnent d'une activation de NF $\kappa$ B induite par la libération massive de TNF $\alpha$  lors de ces processus.

Comme illustré sur la figure 1, l'expression de h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F est capable d'inhiber massivement par un facteur d'environ 20 fois l'activation transcriptionnelle induite par TNF $\alpha$ . Donc dans toutes les pathologies marquées

par une réaction inflammatoire intense due à une libération de  $\text{TNF}\alpha$ , la  $\text{h-}\beta\text{TrCPAF}$  pourrait agir comme un puissant agent anti-inflammatoire. Il y a par exemple actuellement plusieurs tentatives pour mettre en oeuvre une thérapie génique de la polyarthrite rhumatoïde, avec injection dans les articulations lésées de virus recombinants. On peut utiliser dans ces essais de thérapie génique des syndromes inflammatoires, des vecteurs exprimant la  $\text{h-}\beta\text{TrCPAF}$ . Ces vecteurs pourront être de plusieurs types (rétrovirus, adénovirus, Anderson F., Nature, 392, 25-30, 1998). L'expression de la  $\text{h-}\beta\text{TrCPAF}$  pourra être contrôlée par ses effets sur l'inhibition de l'activation de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  par  $\text{TNF}$ .

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation de la protéine  $\text{h-}\beta\text{TrCP}$  ou des séquences d'acides nucléiques codant pour cette protéine ou pour ses fragments peptidiques pour le criblage d'agents thérapeutiques susceptibles de moduler l'interaction de la protéine  $\text{h-}\beta\text{TrCP}$  avec les protéines susceptibles d'être dégradées par le protéasome, en particulier pour le criblage :

- d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine  $\text{h-}\beta\text{TrCP}$  et la protéine Vpu et/ou d'inhiber l'interaction entre la protéine  $\text{h-}\beta\text{TrCP}$  et la protéine Skp1p,
- d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par inhibition ou activation de l'interaction entre la protéine  $\text{h-}\beta\text{TrCP}$  et la protéine Skp1p, ainsi que par réactivation de l'interaction entre la protéine  $\text{h-}\beta\text{TrCP}$  et les protéines  $\beta$ -caténine mutées dans les cellules tumorales ou entre la protéine  $\beta\text{TrCP}$  et la protéine  $\beta$ -caténine normale dans les cellules tumorales dépourvues de la protéine APC.
- d'agents anti-inflammatoires capables de perturber l'activation du facteur de transcription  $\text{NF}\kappa\text{B}$  par inhibition de l'interaction entre la protéine  $\text{h-}\beta\text{TrCP}$  et la protéine  $\text{I}\kappa\text{B}$ ,
- d'agents anti-Alzheimer capables de réduire le taux de dégradation de la  $\beta$ -caténine dans les cellules neuronales par inhibition de l'interaction entre la protéine  $\text{h-}\beta\text{TrCP}$  et la protéine  $\beta$ -caténine.

En effet, en perturbant les interactions Vpu/h- $\beta$ TrCP et/ou Skp1p/h- $\beta$ TrCP, on peut :

- soit inhiber la réplication et la production du virus HIV-1 par des cellules infectées ;

5       - soit inhiber l'entrée en phase S du cycle cellulaire et avoir un effet antiprolifératif.

En perturbant les interactions I $\kappa$ B/h- $\beta$ TrCP et/ou Skp1p/h- $\beta$ TrCP, on peut inhiber la dégradation de la protéine I $\kappa$ B par le protéasome et donc inhiber l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B.

10       Enfin, en activant l'interaction  $\beta$ -caténine mutée/h- $\beta$ TrCP, on peut activer la dégradation de la  $\beta$ -caténine accumulée dans les cellules tumorales. En inhibant l'interaction  $\beta$ -caténine /h- $\beta$ TrCP chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, on peut réduire l'apoptose des cellules neuronales.

#### 15       Criblage de modulateurs de l'interaction h- $\beta$ TrCP/protéines

On peut sélectionner les agents antiviraux soit à partir de banques aléatoires de peptides, à la surface de phages (SCOTT J. et al., Science, 249, 386-390, 1990), soit en utilisant des oligonucléotides de synthèse aléatoires selon la technique de type SELEX (TUERK et GOLD, Science, 249, 505-510, 1990).

20       Cette technique permet d'isoler à partir d'un pool très large d'oligonucléotides, ceux qui ont une grande affinité pour la protéine d'intérêt, dans le cas présent la protéine h- $\beta$ TrCP. Ils sont dénommés aptamers. Parmi ces aptamers, on pourra sélectionner ceux qui inhibent les deux interactions Vpu/h- $\beta$ TrCP et Skp1p/h- $\beta$ TrCP par le criblage ci-après.

25       Le criblage défini ci-dessus peut par exemple être réalisé en utilisant le système double-hybride en levure dans lequel des cellules de levure co-exprimant la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'invention et l'une des protéines Vpu, I $\kappa$ B ou  $\beta$ -caténine, la protéine Skp1p, sont cultivées sur des milieux sélectifs appropriés en présence de la substance à tester ; les milieux sélectifs sont les milieux  
30 couramment utilisés dans ce domaine et donc bien connus de l'homme de métier.



Le système double-hybride en levure est décrit par Fields et Song dans Nature, 340-245-246, 1989 et dans le brevet US 5 667 973. Ce système double hybride, est basé sur la détection des interactions protéine-protéine par activation du gène rapporteur His ou LacZ sous le contrôle de domaines de l'activateur transcriptionnel Gal4 dans la levure.

Dans ce système double-hybride, on cotransforme une levure par un vecteur double-hybride contenant l'ADNc de l'une des protéines et un vecteur contenant l'ADNc de l'autre protéine. Chacun desdits vecteurs contenant soit un domaine de liaison à l'ADN soit un domaine d'activation de la transcription. On fait ensuite exprimer par la levure les deux protéines dans un milieu de culture approprié, par exemple un milieu de culture sans histidine. L'interaction entre les deux protéines hybrides permet l'activation du gène His3 et la croissance des levures sur un milieu sans histidine d'une part, ainsi que l'activation du gène LacZ qui est révélée par une réaction colorimétrique spécifique de la  $\beta$ -galactosidase.

On peut donc vérifier l'interaction lorsque les levures poussent sur un milieu sans histidine et lorsqu'on observe une réaction colorimétrique.

On peut également utiliser le test du halo tel que décrit par Valtz & Peter (Meth-Enzymol-283, 350-365, 1997) pour détecter s'il y a interaction.

On peut également utiliser des variantes du système double-hybride, telles que le système triple-hybride décrit par TIRODE et al. (J. Biol. Chem., 272, 22995-22999, 1997), ou par Colas et Al. (Nature, 380, 548-550, 1996) dans lequel un peptide inhibiteur de l'interaction peut être exprimé comme troisième partenaire pour inhiber l'interaction des deux autres. Une banque de peptides aléatoires peut aussi être utilisée de la sorte.

On peut aussi utiliser le système reverse-hybride décrit par VIDAL et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 10315-10320), dans lequel on sélectionne non pas pour une interaction mais contre une interaction. On peut dans ce système, comme dans le système double-hybride classique, cribler des banques de petites molécules chimiques, y compris issues de la synthèse chimique pour mettre, les levures co-transformées avec les vecteurs double-hybride ou reverse hybride porteurs des fusions avec la protéine Vpu, la protéine I $\kappa$ B, la  $\beta$ -caténine, la protéine h- $\beta$ TRCP

ou la protéine Skp1p, en présence de ces petites molécules à la recherche d'un inhibiteur des interactions Vpu-h- $\beta$ TrCP et Skp1p-h- $\beta$ TrCP ou  $\beta$ -caténine-h- $\beta$ TrCP ou encore I $\kappa$ B-h- $\beta$ TrCP.

Les tests de criblage d'inhibiteurs d'interaction pourront également être effectués en double-hybride par conjugaison (Fomont-Racine et al. 1997, Nature Genetics, 16, 277-282), par double-hybride membranaire (Broder Y.C. et al., 1998, Curr. Biol., 8, 1121-1124), et éventuellement, si les phosphorylations peuvent prendre place dans les bactéries, par double-hybride bactérien (Karimova et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 5752-5756).

Ce criblage peut aussi être effectué *in vitro* en utilisant l'une des protéines Vpu, I $\kappa$ B,  $\beta$ -caténine, ou la protéine Skp1p, et la protéine h- $\beta$ TrCP, l'une des protéines étant immobilisée sur un support approprié et l'autre étant marquée par un moyen quelconque utilisé dans les moyens de détection de substances biologiques, ce moyen de marquage pouvant être par exemple un isotope radioactif, un agent luminescent, de la biotine ou un anticorps spécifique.

L'une des protéines sera de préférence immobilisée sous la forme d'une protéine de fusion avec la glutathion S-transférase (GST) sur des billes d'agarose-gluthation ou en plaques de microtitration, la GST servant d'agent de couplage de ladite protéine sur les billes ou sur les puits des plaques.

A cet effet, on peut utiliser notamment le test de scintillation à proximité (SPA) décrit par BOSWORTH et al. (Nature, 341, 167-168, 1989) et commercialisé par Amersham. Ce test consiste à marquer par un élément radioactif, par exemple le tritium, l'une des protéines et à immobiliser l'autre protéine sur des billes magnétiques ou sur des billes d'agarose-gluthation. L'effet inhibiteur des substances à tester sur l'interaction des deux protéines (Vpu/h- $\beta$ TrCP ou Skp1p/h- $\beta$ TrCP peut être facilement détecter sans séparation des espèces radioactives liées ou libres selon les protocoles décrits par BOSWORTH et al. (*supra*).

On peut également utiliser la technique "Surface Plasmon Resonances" décrite par KARLSSON et al. (J. Immunol. Methods, 145, 229-233, 1991) utilisant le Biacore commercialisé par Pharmacia, pour isoler les inhibiteurs

de l'interaction entre la protéine Vpu et la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'invention ou les inhibiteurs de l'interaction entre la protéine Skp1p et la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'invention.

L'activité inhibitrice des agents antiviraux ainsi sélectionnés pourra  
5 être vérifiée par des tests sur des cellules T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> ou sur des chimpanzés infectés par les virus HIV-1 ou SIV Cpz.

On peut également préparer les agents antitumoraux et les agents anti-inflammatoires, ligands de la protéine h- $\beta$ TrCP de l'invention, par les techniques double-hybride ou apparentées ou par interaction *in vitro* avec des banques  
10 combinatoires de peptides ou autres, comme décrit précédemment. Ils peuvent également être choisis parmi les agents antiviraux qui inhibent l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p décrits ci-après.

La spécificité des agents antiviraux, antitumoraux ou anti-inflammatoires sélectionnés par le test double-hybride peut être ensuite  
15 déterminée par culture de cellules de mammifères, par exemple de cellules humaines transfectées avec la  $\beta$ -TrCP, un fragment de celle-ci en présence d'un gène rapporteur spécifique de la protéine responsable de la pathologie que l'on souhaite traiter.

Ainsi, pour la protéine I $\kappa$ B, on pourra utiliser des cellules humaines  
20 provenant des lignées cellulaires Hela, 293, 293T, etc. et le gène rapporteur dépendant des sites NF $\kappa$ B (3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc) qui contrôle l'expression de la luciférase.

Dans les cellules humaines non stimulées, la  $\beta$ TrCP humaine est exprimée transitoirement à partir d'un vecteur d'expression eucaryote tel que  
25 pCDNA3 ou tout autre vecteur d'expression eucaryote, ayant inséré l'ADN codant pour la  $\beta$ TrCP sous le contrôle d'un promoteur fort du cytomégalovirus CMV ou autre. Une quantité de l'ordre de 3 $\mu$ g de ce vecteur qui permet l'expression de la  $\beta$ TrCP sera cotransfectée par l'une des techniques courantes de transfection (phosphate de calcium, lipofectamine (Life technologies), électroporation  
30 (Ausubel et Sambrook ci-après) etc ..., avec 1 $\mu$ g d'un vecteur rapporteur

dépendant (3Enh- $\kappa$ B-ConA luc) ou indépendant (RSV Luc ou ConA Luc) de sites NF $\kappa$ B qui contrôlent l'expression du gène rapporteur luciférase. Des molécules capables d'inhiber l'interaction h- $\beta$ TrCP-I $\kappa$ B inhiberont l'augmentation d'expression de luciférase dans ce test. Ces inhibiteurs seront ajoutés au milieu de culture pendant au moins 6 heures, 24, 36 ou 48 heures après la transfection. On pourra contrôler la spécificité de ces inhibiteurs en vérifiant qu'ils n'ont aucun effet sur RSV Luc ou ConA Luc. On pourra également utiliser le système Dual kinase de Promega, dans lequel on peut tester en même temps deux vecteurs rapporteurs différents.

10 Selon un protocole expérimental similaire à celui décrit ci-dessus, mais avec des cellules stimulées, on pourra vérifier que l'inhibition induite par l'expression de h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F sur l'activation transcriptionnelle TNF-dépendante a été annulée.

Ainsi, dans ce second test, les cellules humaines sont cotransfectées avec 1 $\mu$ g de vecteur rapporteur, soit 3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc, soit ConA Luc ou RSV Luc, avec 3 $\mu$ g de pCDNA3 exprimant le fragment peptidique h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F, mutant de la  $\beta$ TrCP délétée de sa boîte F. 24 à 48 h après la transfection, les cellules sont traitées pendant 6 h au TNF ou à l'acide okadaïque (OKA) qui sont de puissants activateurs de NF $\kappa$ B (Bauerle et al. Cell, 1996, 87, 13-20). Le mutant h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F a un effet inhibiteur massif sur l'expression du rapporteur luciférase, par rapport à un plasmide contrôle transfecté dans les mêmes conditions. Cet effet est dû à l'inhibition de la dégradation de I $\kappa$ B induite par la liaison du mutant h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F en lieu et place du h- $\beta$ TrCP sauvage endogène. De ce fait, un agent inhibiteur de l'interaction h- $\beta$ TrCP-I $\kappa$ B inhibera aussi l'interaction h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F-I $\kappa$ B, et donc inversera l'effet inhibiteur de h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F. Les inhibiteurs potentiels sont ajoutés au milieu dans les mêmes conditions que celles indiquées ci-dessus. On choisit dans les cellules stimulées au TNF ou à l'OKA, les inhibiteurs qui induisent une augmentation de l'expression du gène rapporteur.

Après avoir sélectionné des inhibiteurs dans les deux tests précédents, on peut vérifier dans un troisième test qu'ils sont capables d'inhiber l'activation de NF $\kappa$ B induite par la stimulation des cellules au TNF ou à l'OKA.

On traite avec les inhibiteurs potentiels les cellules transfectées uniquement par 1  $\mu$ g de vecteur rapporteur (3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc) et stimulées pendant 6 h au TNF ou à l'OKA. Ces inhibiteurs, pour être spécifiques, ne devront avoir d'effet que sur les vecteurs rapporteurs dépendants de I $\kappa$ B, et non sur les autres vecteurs rapporteurs (ConA ou RSV).

Pour la  $\beta$ -caténine, on pourra utiliser des cellules humaines provenant des lignées ci-dessus transformées avec la  $\beta$ -caténine mutée ou le fragment peptidique de  $\beta$ TrCP dépourvu de la boîte F en présence du vecteur Top-TK-Luci qui contient un multimètre de sites TCF-LEF ou Top-tk-Luci qui contient un multimètre contrôle inactif de sites TCF-LEF.

15

#### Détection de mutations de $\beta$ -caténine

De plus, comme on peut aisément distinguer une  $\beta$ -caténine mutée oncogénique de la  $\beta$ -caténine sauvage par le fait que la première, contrairement à la seconde, est incapable de se lier à la  $\beta$ -TrCP en double-hybride, on peut détecter des mutations de la  $\beta$ -caténine dans les tumeurs humaines, par mesure en double-hybride de l'interaction avec la  $\beta$ -TrCP.

Ce test est intéressant car on constate des mutations de la  $\beta$ -caténine dans de nombreux cancers, tels que cancer du colon, mélanome, hépatocarcinomes, etc. La seule manière de détecter ces mutations jusqu'à présent a été de séquencer la  $\beta$ -caténine à partir de RT-PCR sur l'ARN des tumeurs étudiées. Pour plus de sécurité, plusieurs séquences double brins doivent être faites dans ce test de l'art antérieur. De plus, l'existence d'une mutation ne signe pas en elle-même le caractère oncogénique de cette mutation. Il pourrait s'agir d'un polymorphisme sans aucun lien avec la tumorigénicité.

L'avantage du test double-hybride avec la protéine  $\beta$ -TrCP permet d'obtenir dans des délais équivalents à ceux nécessaires à l'obtention d'une séquence, une réponse claire quant au nombre de séquences oncogéniques mutées de la  $\beta$ -caténine détectées à partir de l'ARN tumoral. Sur un grand nombre de colonies, le  
5 pourcentage de formes oncogéniques de la  $\beta$ -caténine incapables d'interagir avec la  $\beta$ -TrCP, par rapport aux formes sauvages qui interagissent avec la  $\beta$ -TrCP, peut être déterminé précisément. Le test peut s'effectuer dans un temps équivalent à celui nécessaire pour l'obtention de quelques séquences, et pour un coût réduit.

10 Les étapes de ce test sont les suivantes :

1- Préparation de l'ARN total d'une biopsie d'une tumeur et du tissu sain environnant comme contrôle, par l'une des diverses techniques ou kits de préparation de l'ARN (Ausubel et al. Current protocols in Molecular Biology).

2- Amplification par RT-PCR à partir des échantillons ARN, des séquences  $\beta$ -  
15 caténine de la tumeur et du tissu sain environnant, en utilisant un couple d'oligonucléotides permettant l'amplification soit uniquement de la partie N-terminale (1-130) qui contient les mutations oncogéniques les plus fréquemment rencontrées (Rubinfeld, B. et al. 1997, Science, 275, 1790-1792 ; De La Coste et al., 1998, Proc. Natl.Acad.Sci. USA, 95, 8847-8851), soit de l'ensemble de la  
20 séquence codante de la  $\beta$ -caténine.

3- Insertion de ces fragments amplifiés par ligation dans un des vecteurs double-hybride, comme par exemple pGAD1318, de manière à obtenir une fusion en phase avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4, ou du domaine équivalent d'activation de la transcription ou de liaison à l'ADN codé par le  
25 vecteur double-hybride utilisé.

4- Transformation de bactéries de diverses souches appropriées et étalement de la totalité de la transformation sur milieu LB-ampicilline.

5- Recueil de l'ensemble des colonies et minipréparation de plasmide (Ausubel supra).

6- Des levures L40 ou toute autre souche de levure appropriée, seront cotransformées par le plasmide contenant les séquences  $\beta$ -caténine de la minipréparation ci-dessus avec un hybride de fusion contenant la  $\beta$ TrCP, par exemple pLexA-bTrCP, dans lequel la  $\beta$ TrCP est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de LexA. Un essai double-hybride est effectué sur l'ensemble des colonies obtenues, par exemple par étalement des levures cotransformées sur milieu DO-W-L, puis transfert des colonies sur milieu sélectif pour la détection des interactions, c'est-à-dire milieu DO-W-L-H, ou en présence de X-Gal pour la détection des interactions par production de  $\beta$ -galactosidase (Bartel P & Fields S. Meth. Enzymol. 1995, 254, 241-263).

Les réactifs nécessaires pour ce test sont les suivants :

- 1- UnVecteur pGAD1318 prédigéré aux sites appropriés pour insérer le fragment amplifié obtenu par RT-PCR.
- 2- Les oligonucléotides appropriés pour amplifier la séquence de la  $\beta$ -caténine et insérer ensuite les séquences  $\beta$ -caténine amplifiées. Les oligonucléotides amorces pour l'amplification seront choisis en fonction du mode d'insertion du fragment amplifié et des sites retenus.
- 3- Le plasmide pBTM116- $\beta$ TrCP exprimant la  $\beta$ TrCP en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de LexA.
- 4- A titre de contrôle des plasmides codant pour des hybrides de fusion avec des protéines contrôles, par exemple pLexRas et pGAD1318Raf.

On pourra également pour ce test appliquer la technique de "Gap repair" (Schwartz, H., et al. Mutation detection by a two-hybrid assay. (1998). Hum. Mol. Gen., 7, 1029-1032.) pour insérer la séquence du fragment amplifié de la  $\beta$ -caténine dans le vecteur double-hybride et transformer directement des levures sans passer par l'étape de transformation préalable dans les bactéries.

L'invention va maintenant être décrite en détail à l'aide de l'exposé expérimental ci-après.

Une grande partie des techniques décrites dans ces exemples, bien connues de l'homme du métier, est exposée en détail dans l'ouvrage de SAMBROOK et al. (*supra*) ou dans l'ouvrage de AUSUBEL et al. (*supra*).

La description ci-après sera mieux comprise à l'aide des figures 1 à 9 sur lesquelles :

- la figure 1A est la photographie d'une boîte de Petri montrant la croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant Vpu<sub>C</sub> + VBP1 ; Vpu<sub>C</sub> + h-βTrCP ; Vpu<sub>C-2/6</sub> + h-βTrCP ; Vpu<sub>C</sub> ; h-βTrCP + Vpu<sub>C</sub> et h-βTrCP + CD4<sub>C</sub> sur milieu en présence d'histidine (His+), sur milieu en l'absence d'histidine (His-) et sur milieu en présence du substrat de la β-galactosidase X-Gal (β-Gal) ;

- la figure 1B est la photographie d'un gel (Northern blot) montrant 3 ARNm de la protéine h-βTrCP de l'invention ;

- la figure 1C est la photographie d'une immunoempreinte (Western blot) montrant l'expression de la protéine h-βTrCP de l'invention ;

- la figure 2 donne les séquences de 4 protéines, h-βTrCP de l'invention et βTrCP1 de *Xenopus*, Met30p de *Saccharomyces cerevisiae* et Scon2p de *Neurospora crassa* ;

- la figure 3 est la photographie d'un gel SDS-PAGE 15% montrant l'interaction entre Vpu<sub>C</sub> et la protéine h-βTrCP de l'invention produite *in vitro* ;

- la figure 4 est la photographie d'une boîte de Petri montrant la croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant Skp1p + h-βTrCP ; Skp1p + h-βTrCP-Δ7W ; Skp1p + VBP1 et Skp1p + CD4<sub>C</sub> sur milieu en présence d'histidine (His+), sur milieu en l'absence d'histidine (His-) et sur milieu en présence du substrat de la β-galactosidase X-Gal (β-Gal) ;

- la figure 5 est une représentation schématique de la dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu présentant le réseau d'interactions décrit précédemment,

- la figure 6 est la photographie d'une boîte de Petri montrant la croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant



$\beta$ TrCP + I $\kappa$ B $\alpha$  ;  $\beta$ -TrCP + I $\kappa$ B $\alpha$  S32-36AA ;  $\beta$ TrCP + Raf ; Ras + I $\kappa$ B $\alpha$  ;  $\beta$ TrCP + Vpuc et Ras + Raf sur milieu His+, sur milieu His- et l'expression de  $\beta$ -Gal ;

- la figure 7 est une représentation graphique montrant l'expression de la luciférase (exprimée en unités de lumière par  $\mu$ g : RLU/ $\mu$ g de protéine ) dans les cellules transfectées avec les constructions h- $\beta$ TrCP et h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F et les plasmides de contrôle et les vecteurs rapporteurs ci-après : 3Enh-KB-ConA luc ; ConA luc ; RSV luc.

- la figure 8 est la photographie d'une boîte de Petri montrant la croissance de cellules de levure cotransformées par les plasmides contenant  $\beta$ TrCP +  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> ;  $\beta$ TrCP +  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> S33-37AA ;  $\beta$ TrCP-2 +  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> ;  $\beta$ TrCP-2 +  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> S33-37AA et  $\beta$ TrCP +  $\beta$ Cat sur milieu His+, sur milieu His- et l'expression  $\beta$ -Gal ;

- la figure 9 est une représentation graphique donnant l'expression de la luciférase (RLU/ $\mu$ g protéine) dans les cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3, les plasmides contenant  $\beta$ -Cat  $\Delta$ N,  $\beta$ TrCP,  $\beta$ -TrCP $\Delta$ F, KIA 696 ( $\beta$ -TrCP-2) et KIA 696  $\Delta$ F ( $\beta$ -TrCP2 $\Delta$ F).

#### Exemple 1 : Criblage double-hybride en levure / mise en évidence de la séquence d'ADNc de la protéine h- $\beta$ TrCP et de la protéine h- $\beta$ TrCP

On a choisi comme cible le domaine cytoplasmique de la protéine Vpu. On a procédé à la fusion des résidus d'acides aminés 28 à 81 de la protéine Vpu de l'isolat LAI de HIV-1 avec le domaine de fixation de l'ADN de Gal4 (Gal4BD). La banque d'ADNc criblée était celle des cellules Jurkat (lignée lymphocytaire T humaine, ATCC n°TIB 152) et elle a été fusionnée au domaine d'activation de Gal4 (Gal4AD) dans le vecteur pGAD1318 (BENICHOU et al. J. Biol. Chem., 269, 30073-30076, 1994).

Le clone de 1,3 kb qui a été isolé initialement par le système double-hybride (dénommé VBP1) code pour un ADN complémentaire partiel. Cet ADNc partiel code pour un fragment de 319 acides aminés correspondant au domaine C-terminal de la protéine h- $\beta$ TrCP. Il contient sept motifs répétitifs suivis d'une

queue C-terminale de 24 acides aminés. Ces motifs répétitifs, qui sont connus, sont dénommés motifs WD parce que leur extrémité se termine habituellement par la séquence Trp-Asp (WD) (NEER et al., *Nature*, 371, 297-300, 1994). On notera que les motifs WD, qui sont impliqués dans des interactions protéine-protéine, sont généralement présents dans des protéines requises pour la dégradation protéique médiée par l'ubiquitine (GHISLAIN et al., *Embo*, 15, 18, 4884-4899, 1996).

Le clone ainsi isolé a été caractérisé par séquençage d'ADN sur séquenceur automatisé Applied Biosystem connu sous la dénomination ABI 373A. La technique de séquençage d'ADN est bien connue de l'homme du métier et est décrite notamment dans l'ouvrage SAMBROOK et al., "Molecular Cloning : a Laboratory Manual" Ed. Cold Spring Houbor Press, NY, 1989.

Une recherche dans les banques d'ADNc a montré que ce clone est l'homologue d'une séquence codant pour la protéine  $\delta$ TrCP de *Xenope* identifiée préalablement par SPEVAK et al. (*Mol. Cell. Biol.*, 13, 4953-4966, 1993).

L'ADNc complet (2,1 kb) de la protéine h- $\delta$ TrCP, qui a la SEQ ID No. 1, a été obtenu par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) sur une préparation de plasmide correspondant à la banque d'ADN complémentaires de cellules Jurkat, telles que définies précédemment, dans le vecteur pGAD1318.

En plus des sept motifs WD identifiés dans le fragment C-terminal, la protéine h- $\delta$ TrCP entière selon l'invention possède un domaine N-terminal d'environ 250 acides aminés. Le fragment N-terminal contient un motif pour lequel un consensus a été récemment défini sous le terme de boîte F et dont le rôle serait de cibler des protéines vers la machinerie de dégradation des protéines médiée par l'ubiquitine grâce à l'interaction de protéines contenant cette boîte F avec la protéine Skp1p (BAI et al., 1996, *supra*).

Ainsi la protéine h- $\delta$ TrCP, par ses motifs WD, est d'une part capable d'interagir avec la protéine Vpu, et d'autre part possède un motif boîte F qui interagit avec la protéine Skp1p et est donc capable de cibler les protéines vers les voies de dégradation par le protéasome.

La protéine h- $\beta$ TrCP possède 569 acides aminés et comprend une boîte F et sept motifs WD dont la position dans la séquence SEQ ID N° 2 est la suivante :

- boîte F : acides aminés 147-191,
- premier motif WD : acides aminés 259-292,
- 5 - deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
- troisième motif WD : acides aminés 343-372,
- quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
- cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
- sixième motif WD : acides aminés 467-492,
- 10 - septième motif WD : acides aminés 516-544.

On a recherché si la protéine ainsi isolée avait une quelconque homologie avec des protéines déjà connues en utilisant la technique, bien connue de l'homme du métier, d'alignement des séquences selon le programme de MACAW (SCHULER et al., Proteins : structure, function and genetics, 9, 180-190, 1991).

- 15 Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 2 qui montre que la protéine h- $\beta$ TrCP a une homologie :

- de 88% avec la protéine x- $\beta$ TrCP1 de *Xenopus*,
- de 33% avec la protéine Met30p de *Saccharomyces cerevisiae*, inhibiteur de transcription impliqué dans la biosynthèse,
- 20 • de 31% avec la protéine Scon2p de *Neurospora crassa*.

La figure 2 montre également l'emplacement de la boîte F et des motifs WD.

#### Exemple 2 : Clonage de l'ADNc de la protéine h- $\beta$ TrCP

- L'ADNc de la protéine h- $\beta$ TrCP ayant la SEQ ID N° 1 a été amplifié par
- 25 PCR à partir de 2  $\mu$ g d'ADN du plasmide de la banque d'ADNc pGAD en utilisant deux tours d'amplification, le couple externe d'amorces pour le premier tour étant constitué de l'amorce sens A ayant la SEQ ID N° 3 (dans pGAD1318) et de l'amorce antisens B ayant la SEQ ID N° 4 (dans VPB1) et le couple interne d'amorces pour le deuxième tour étant constitué de l'amorce sens C ayant la SEQ

ID N° 5 (dans pGAD1318) et de l'amorce antisens D ayant la SEQ ID N° 6 (dans VPB1).

A la suite de cette procédure, on a isolé un fragment de 1,4 kb, souscloné dans le plasmide pGAD-VPB1 sous la forme d'un fragment 5'SpeI-3'BglII, pour reconstituer le clone pGAD-h- $\beta$ TrCP.

Les séquences codant pour VPB1 (résidus d'acides aminés 251 à 569 de la protéine h- $\beta$ TrCP) ou codant pour la protéine h- $\beta$ TrCP entière ont été sousclonées dans les vecteurs pGBT9, pGEX4T2 (Pharmacia) ou pCDNA3 (uniquement pour la protéine h- $\beta$ TrCP) (Invitrogen) en utilisant des procédures standards.

10

### Exemple 3 : Interaction spécifique de la protéine Vpu avec la protéine h- $\beta$ TrCP

Les résultats expérimentaux qui démontrent l'interaction spécifique de la nouvelle protéine humaine  $\beta$ TrCP avec la protéine Vpu sont illustrés sur la figure 1.

15 3a- Interaction entre la protéine Vpu et la protéine h- $\beta$ TrCP par le crible double-hybride décrit précédemment.

La figure 1A démontre l'interaction, par la technique double-hybride, de la région C-terminale de la protéine h- $\beta$ TrCP (VPB1) issue de la banque d'ADNc de cellules Jurkat (ligne 1) ou de la protéine h- $\beta$ TrCP entière (ligne 2) fusionnée au domaine d'activation de Gal4, avec le domaine cytoplasmique de Vpu fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ou vice-versa (ligne 5). L'interaction se manifeste par l'activation des deux gènes rapporteurs His3 et LacZ ; le gène His3 permet la pousse des levures en l'absence d'histidine (panneau -His), et le gène LacZ induit la production de  $\beta$ -galactosidase manifestée par la coloration bleue en présence du substrat X-Gal (panneau  $\beta$ -Gal). Cette interaction est spécifique puisqu'elle n'est pas retrouvée entre la protéine Vpu et le vecteur seul (ligne 4), ou entre la protéine h- $\beta$ TrCP et une autre protéine telle la région cytoplasmique de CD4 (ligne 6). Le panneau + His est un panneau contrôle qui montre que toutes les combinaisons, y compris lorsqu'il n'y a pas d'interaction, poussent en présence d'histidine.

30

Il faut noter que la protéine h- $\beta$ TrCP n'interagit pas avec un mutant de la protéine Vpu inactif, Vpuc-2/6 (ligne 3), clone muté sur les deux résidus sérine Ser 52 et Ser 56, qui sont essentiels pour l'activité de Vpu (MARGOTTIN et al, 1996, *supra*). Ce résultat démontre qu'il y a corrélation entre la capacité de Vpu à interagir avec la h- $\beta$ TrCP et son activité.

### 3b- Mise en évidence de l'interaction par analyse "Northern Blot".

Par analyse "Northern Blot" d'ARNm de différentes lignées cellulaires humaines en utilisant une sonde 5', on a trouvé que plusieurs ARN messagers (ARNm) hybrident avec une sonde correspondant à h- $\beta$ TrCP (Fig. 1B). Ces ARNm de tailles respectives 2,4 kb, 3,5 kb et 7 kb, sont retrouvés dans tous les tissus humains testés. Cette multiplicité d'ARNm est réminiscente de la situation décrite par HUDSON et al. (Dev. Genet., 19, 190-198, 1996) pour les ARNm de la  $\beta$ TrCP de *Xenope*, pour laquelle 3 ARNm différents de tailles respectives voisines de celles trouvées ici pour les ARNm de la h- $\beta$ TrCP ont été rapportés.

### 3c- Mise en évidence de l'interaction par analyse "Western Blot".

Des anticorps anti-peptidiques anti-h- $\beta$ TrCP (Abs) ont été produits chez des lapins par immunisation avec le peptide de synthèse 275-293 correspondant au premier motif WD de la protéine h- $\beta$ TrCP. Ces anticorps Abs ont été purifiés selon l'affinité par adsorption sur 30  $\mu$ g de la protéine de fusion GST-VBP1, exprimée chez *E. Coli* à partir du vecteur pGEX-VBP1 et immobilisée après électrobuvarage sur une membrane de nitrocellulose. Les anticorps Abs purifiés ont ensuite été élués par l'éluant glycine.HCl, pH 3,0, neutralisés avec du tampon 1M TRIS, pH 8,0, et utilisés pour une analyse, par la technique de Western blot, de l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP dans les cellules humaines Sup T1 (T1), dans les réticulocytes de lapins (RRL) et dans les lysats de membrane microsomique canine (CMM).

La Figure 1C montre l'expression de la protéine h- $\beta$ TrCP détectée dans un lysat de cellules T humaines de la lignée Sup T1 ( ligne 1), de réticulocytes de lapin de Promega (ligne 3), par la technique "Western blot" en utilisant les anticorps anti-h- $\beta$ TrCP dirigés contre le peptide 275-293 obtenus précédemment. En revanche aucune protéine correspondant à la h- $\beta$ TrCP n'a pu être détectée dans des

membranes de microsomes de pancréas de chien de Promega (ligne 2). La taille de la protéine h-βTrCP détectée ( 60 kD) indique que le clone d'ADNc de h-βTrCP qui a été caractérisé et qui est représenté sur la figure 2 est capable de coder pour la protéine h-βTrCP entière.

5

Exemple 4 : Cartographie des sites d'interaction entre Vpuc et la protéine h-βTrCP

Les sites d'interaction entre le domaine cytoplasmique de la protéine Vpu (Vpuc) et la protéine h-βTrCP de l'invention ont été déterminés de la façon  
10 suivante.

Au niveau de Vpuc, il a été montré que la mutation des sérines aux positions 52 et 56 (clone Vpuc-2/6) abolissait intégralement l'interaction entre Vpu et h-βTrCP.

Au niveau de h-βTrCP, les résultats d'interaction double-hybride avec le domaine cytoplasmique de Vpu et les différents mutants décrits ci-après montrent  
15 que l'ensemble des motifs WD et la queue C-terminale sont requis pour une interaction optimale, comme indiqué dans le tableau ci-après.

Les mutants utilisés sont les suivants :

- VPB1-ΔW<sub>1</sub> (clone VPB1 dont le premier domaine WD a été délété ; résidus 292 à 569), qui correspondent à un fragment BglII-XhoI de VBP1,
  - 20 • VPB1-ΔW<sub>4-7</sub> (clone VPB1 dont les domaines WD 4 à 7 ont été délétés ; résidus 292 à 396), et
  - VPB1-ΔC-ter (clone VPB1 dont la queue C-terminale après le 7<sup>ème</sup> domaine WD a été délétée ; résidus 292 à 545)
- par PCR en utilisant respectivement l'amorce sens C, décrite précédemment, et les  
25 amorces antisens E et F suivantes dans VBP1.

Amorce E : SEQ ID N° 7

Amorce F : SEQ IND N° 8.

Le mutant h-βTrCP-Δ7W (clone h-βTrCP dont les sept domaines WD ont été délétés ; résidus 1 à 291) a été construit en insérant un fragment SpeI-BglII à  
30 partir de la protéine h-βTrCP dans le vecteur pGAD1318 et le mutant βTrCPAF

(résidus délétés : 32 à 179) a été obtenu par délétion du fragment AvrII-Asp718 de la protéine h-βTrCP avec conservation du cadre de lecture.

On a vérifié que l'interaction entre les protéines Vpu et h-βTrCP pouvait avoir lieu *in vitro* par le procédé suivant : les deux protéines ont été introduites dans du  
5 lysat de réticulocytes de lapins (RRL). Les complexes Vpu/βTrCP formés *in vitro* ont été identifiés par co-immunoprécipitation en utilisant des anticorps anti-h-βTrCP dirigés contre le peptide 553-569, préparés par le même procédé que celui utilisé pour obtenir les anticorps anti-h-βTrCP dirigés contre le peptide 275-293.

10 La figure 3 illustre l'interaction *in vitro* entre les protéines Vpu et h-βTrCP. La ligne 1 montre que la protéine Vpu n'est pas reconnue par l'antisérum anti-h-βTrCP, tandis que la ligne 5 montre qu'elle précipite en présence d'un antisérum anti-Vpu. La ligne 2 montre que les anticorps anti-h-βTrCP sont capables de coprécipiter la protéine Vpu co-traduite *in vitro* avec la protéine  
15 h-βTrCP. La ligne 4 montre que le double mutant de Vpu muté sur les positions Ser52 et Ser56, incapable d'induire la dégradation de CD4, n'interagit pas avec la protéine h-βTrCP, et n'est donc pas coprécipité par des anticorps anti-h-βTrCP, tandis que les lignes 6 et 7 montrent que ce mutant Vpu<sub>c-2/6</sub> est traduit avec la même efficacité que la protéine Vpu.

TABLEAU

Mutants à délétion de h- $\beta$ TrCP	Interaction avec Vpuc
h- $\beta$ TrCP: — <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> — ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ —	+++
VBP1: — ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ —	+++
VBP1- $\Delta$ W1: ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ —	-
VBP1- $\Delta$ C-ter: — ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ —	+
VBP1- $\Delta$ W4-7: — ① ② ③ —	+
h- $\beta$ TrCP- $\Delta$ 7W: — <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span> —	-



#### Exemple 5 : Interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p

Afin de démontrer que le motif boîte F était bien fonctionnel et pouvait donc effectivement servir au ciblage vers le protéasome par l'intermédiaire de la protéine Skp1p, on a réalisé un crible double-hybride entre le domaine N-terminal  
 5 de la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p, ce qui a permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

La protéine humaine Skp1p décrite dans BAI et al. (1996, *supra*) a été sousclonée dans le vecteur pLex10 pour une analyse d'interaction avec la protéine h- $\beta$ TrCP dans la souche de levure L40 (VOJTEK et al. Cell, 74, 205-214, 1993).

10 La figure 4 illustre les résultats obtenus. La ligne 1 de la figure 4 montre tout d'abord que la protéine h- $\beta$ TrCP interagit avec la protéine Skp1p. La ligne 2 montre que le domaine N-terminal suffit à obtenir l'interaction, alors que la ligne 3 montre que l'absence du domaine N-terminal de la protéine h- $\beta$ TrCP dans VBP1 fait perdre toute interaction avec la protéine Skp1p. Ces résultats sont des  
 15 arguments supplémentaires importants en faveur d'un rôle de la protéine h- $\beta$ TrCP dans la dégradation médiée par la protéine Vpu du récepteur CD4, et également corroborent les résultats de FUJITA et al. (1997, *supra*) et de SCHUBERT et al. (1997, *supra*) montrant que la dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu devrait avoir lieu dans le protéasome. Il est à noter que le domaine  
 20 cytoplasmique de CD4 est incapable de se lier directement à la protéine Skp1 (ligne 4).

#### Exemple 6 : Modèle du réseau d'interactions impliqué dans la dégradation du récepteur CD4

25 La dégradation du récepteur CD4 induite par la protéine Vpu est effectuée par le réseau d'interactions a) entre la protéine Vpu et le récepteur CD4, b) entre la protéine Vpu et les motifs WD de la protéine h- $\beta$ TrCP et c) entre la boîte F de la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p, cette dernière interaction permettant d) le ciblage du complexe Vpu/CD4 vers le protéasome.

30 Ce réseau d'interactions est illustré schématiquement sur la figure 5.

C'est par l'intermédiaire d'un tel réseau d'interactions que la dégradation du récepteur CD4 par le protéasome via la protéine Vpu est provoquée.

La dégradation du récepteur CD4 permet la libération de la protéine d'enveloppe Gp160 et donc la libération du virus HIV-1 infectieux.

- 5 Un des moyens pour empêcher le développement du virus HIV-1 chez le patient atteint consiste donc à empêcher la dégradation du récepteur CD4. Un des moyens pour empêcher cette dégradation au vu du procédé de dégradation ci-dessus consiste à rechercher des inhibiteurs, ou agents antiviraux anti-HIV, inhibant l'interaction soit entre la protéine Vpu et la protéine h- $\beta$ TrCP, soit entre
- 10 la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p par les procédés décrits précédemment.

#### Exemple 7 : Interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine I $\kappa$ B

- Pour ce test double-hybride en levure, on a fusionné les protéines décrites ci-dessous, soit au domaine d'activation de la transcription de Gal4 (Gal4D), soit au
- 15 domaine de liaison de l'ADN de LexA :

- $\beta$ TrCP = protéine humaine  $\beta$ TrCP de la présente invention,
- I $\kappa$ B $\alpha$  ,
- I $\kappa$ B $\alpha$  S32-36A = mutant de I $\kappa$ B $\alpha$  au niveau des sérines S32 et S36 de sorte qu'il n'y a pas phosphorylation,
- 20 - Ras = protéine contrôle,
- Raf = protéine contrôle,
- Vpuc = protéine Vpu cytoplasmique telle que décrite précédemment.

Les résultats expérimentaux qui démontrent l'interaction spécifique de la nouvelle protéine humaine  $\beta$ TrCP avec la protéine I $\kappa$ B sont illustrés sur la figure 6.

- 25 Grâce à ce test double-hybride, il est montré que :
- les deux protéines h- $\beta$ TrCP et I $\kappa$ B sont capables d'interagir,
  - l'interaction h- $\beta$ TrCP/I $\kappa$ B est spécifique des deux hybrides puisque, lorsque l'un des deux hybrides est remplacé par un hybride avec une autre protéine telle que Gal4AD-Raf ou LexABD-Ras, il n'y a plus d'interaction, alors que ces deux
  - 30 hybrides contrôles sont capables d'interagir, et

- cette interaction est perdue quand les résidus sérines S32 et S36 de la protéine I $\kappa$ B sont mutés en résidus non phosphorylables comme Alanine.

Dans ce test, on a également observé une interaction entre la protéine Vpu du virus HIV-1 et la protéine h- $\beta$ TrCP.

5

Exemple 8 : Interaction I $\kappa$ B/h- $\beta$ TrCP en cellules humaines par modulation de l'activation transcriptionnelle des gènes rapporteurs de l'activité NF $\kappa$ B

Dans des cellules non stimulées (NS) de la lignée cellulaire 293, la protéine  $\beta$ TrCP humaine ou le fragment h- $\beta$ TrCPAF sont exprimés transitoirement à partir  
10 d'un vecteur d'expression eucaryote tel que pCDNA3 (Invitrogen), ayant inséré l'ADNc codant pour la h- $\beta$ TrCP sous le contrôle d'un promoteur du cytomégalo virus fort (CMV). Une quantité de 3  $\mu$ g de ce plasmide qui permet l'expression de la h- $\beta$ TrCP ou du fragment h- $\beta$ TrCPAF sont cotransfectés par lipofectamine (Life technologies), avec 1  $\mu$ g d'un vecteur rapporteur dépendant  
15 (3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc) ou indépendant (RSV Luc ou ConA Luc) de sites NF $\kappa$ B qui contrôlent l'expression du gène rapporteur luciférase.

Les résultats obtenus (Figure 7) montrent que h- $\beta$ TrCPAF est capable d'agir comme un transdominant négatif. h- $\beta$ TrCPAF inhibe par compétition avec la  $\beta$ TrCP endogène, l'activation de NF $\kappa$ B induite par le TNF ou l'acide okadaïque  
20 (OKA). Cette activation de NF $\kappa$ B est mesurée par l'activité d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur qui a trois sites de fixation à NF $\kappa$ B (3Enh- $\kappa$ B-ConA Luc) (Arenzana et al., 1993, J. Virol., 67, 6596-6609). En revanche, la h- $\beta$ TrCP a un effet activateur sur l'activation de NF $\kappa$ B. La h- $\beta$ TrCP ou le fragment h- $\beta$ TrCPAF n'ont aucun effet sur la transcription d'un gène rapporteur dirigé par  
25 un promoteur ne contenant pas de sites NF $\kappa$ B (RSV Luc) (Invitrogen).

Exemple 9 : Interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ -caténine

Pour ce test double-hybride, on a fusionné les ADNc codant pour les protéines décrites ci-dessous, soit au domaine d'activation de la transcription de Gal4  
30 (Gal4AD), soit au domaine de liaison à l'ADN de LexA (LexABD) :

- $\beta$ TrCP = protéine humaine  $\beta$ TrCP de la présente invention,
- KIAA0696 ( $\beta$ TrCP-2) = protéine humaine  $\beta$ TrCP isolée par ISHIKAWA et al. (DNA Research, 5, 169-176, 1998),
- $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> = protéine  $\beta$ -caténine normale (domaine N-terminal ; 1-130),
- 5 -  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> S33-37AA = protéine  $\beta$ -caténine oncogène mutée sur les résidus sérine S33 et S37 de sorte qu'il n'y a pas phosphorylation,
- $\beta$ Cat = protéine  $\beta$ -caténine normale entière,
- Skp1 = protéine Skp1p du virus HIV-1 telle que décrite précédemment.

Les résultats expérimentaux qui démontrent qu'il existe une interaction  
10 spécifique de la nouvelle protéine humaine  $\beta$ TrCP avec la protéine  $\beta$ -caténine sont illustrés sur la figure 8.

Grâce à ce test double-hybride, il est montré que :

- les deux protéines h- $\beta$ TrCP et  $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> sont capables d'interagir,
- l'interaction h- $\beta$ TrCP/ $\beta$ Cat<sub>1-130</sub> est perdue quand les résidus sérine S33 et  
15 S37 sont mutés en résidus non phosphorylables ( $\beta$ -caténine oncogène), et
- la  $\beta$ TrCP-2 n'est pas capable de réagir ni avec la  $\beta$ -caténine non mutée, ni avec la  $\beta$ -caténine mutée.

Il est à noter qu'on observe également une interaction, entre la protéine  $\beta$ -caténine entière et la protéine h- $\beta$ TrCP.

20

Exemple 10 : Activation de la transcription du gène rapporteur TCF/LEF par expression de la  $\beta$ -caténine mutée ou de h- $\beta$ TrCP  $\Delta$ F dans les cellules humaines 293.

On a transfecté des cellules HEK 293 avec le vecteur rapporteur Top-TK-Luci,  
25 qui contient un multimère de sites TCF-LEF ou le vecteur rapporteur Top-TK-Luci, qui contient un multimère contrôle inactif de sites TCF-LEF. Ces constructions sont cotransfectées avec le vecteur d'expression pCDNA3 (Invitrogen), soit vide comme contrôle, soit exprimant un fragment oncogénique de la  $\beta$ -caténine, à savoir la  $\beta$ -caténine dépourvue de la partie  
30 N-terminale  $\beta$ -cat $\Delta$ N, soit exprimant la h- $\beta$ TrCP ou le  $\beta$ TrCP $\Delta$ F. L'activité

luciférase est mesurée 24 h après la transfection et normalisée à une activité Renilla Luciférase contrôle obtenue par co-transfection de cellules avec le vecteur RSV-Renilla (Promega).

Les résultats obtenus, qui figurent sur la figure 9, montrent que la

- 5 h- $\beta$ TrCP selon l'invention inhibe l'activité d'un gène rapporteur contrôlé par un promoteur TCF/LEF, qui répond à des modifications de niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine (Morin P.J. et al. 1997, Science, 275, 1787-1790). Ceci est en faveur de l'augmentation de la dégradation de la  $\beta$ -caténine par la h- $\beta$ TrCP. En revanche, le h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F induit au contraire une activation de ce gène rapporteur, ce qui
- 10 indique que la dégradation de la  $\beta$ -caténine est inhibée par expression de h- $\beta$ TrCP $\Delta$ F. Par contre, en ce qui concerne la protéine KIAA 0696  $\beta$ -TrCP2 dans le même système de gène rapporteur, l'effet positif induit par la protéine KIAA 0696, et l'effet négatif induit par le KIAA 0696  $\Delta$ F ( $\beta$ TrCP2 $\Delta$ F) sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus
- 15 avec les constructions équivalentes  $\beta$ TrCP.

L'ensemble de ces résultats démontrent donc que c'est la h- $\beta$ TrCP de l'invention, et non la protéine KIAA 0696, qui est le médiateur de la dégradation de la  $\beta$ -caténine, ces sites TCF-LEF.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSERM  
 (B) RUE: 101, Rue de Tolbiac  
 (C) VILLE: PARIS  
 (E) PAYS: FRANCE  
 (F) CODE POSTAL: 75654 Cédex13

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Protéine humaine  $\beta$ TrCP de ciblage  
 des protéines vers les voies de dégradation par le protéasome

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk  
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 2151 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMBLEMMENT: 70..1776

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TGCGTTGGCT GCGGCCTGGC ACCAAGGGG CGGCCCCGGC GGAGAGCGGA CCCAGTGGCC	60
TCGGCGATT ATG GAC CCG GCC GAG GCG GTG CTG CAA GAG AAG GCA CTC	108
Met Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu	
1 5 10	
AAG TTT ATG AAT TCC TCA GAG AGA GAA GAC TGT AAT AAT GGC GAA CCC	156
Lys Phe Met Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro	
15 20 25	
CCT AGG AAG ATA ATA CCA GAG AAG AAT TCA CTT AGA CAG ACA TAC AAC	204
Pro Arg Lys Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn	
30 35 40 45	
AGC TGT GCC AGA CTC TGC TTA AAC CAA GAA ACA GTA TGT TTA GCA AGC	252
Ser Cys Ala Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser	
50 55 60	
ACT GCT ATG AAG ACT GAG AAT TGT GTG GCC AAA ACA AAA CTT GCC AAT	300
Thr Ala Met Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys L u Ala Asn	
65 70 75	

GGC ACT TCC AGT ATG ATT GTG CCC AAG CAA CGG AAA CTC TCA GCA AGC Gly Thr Ser Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser 80 85 90	348
TAT GAA AAG GAA AAG GAA CTG TGT GTC AAA TAC TTT GAG CAG TGG TCA Tyr Glu Lys Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser 95 100 105	396
GAG TCA GAT CAA GTG GAA TTT GTG GAA CAT CTT ATA TCC CAA ATG TGT Glu Ser Asp Gln Val Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys 110 115 120 125	444
CAT TAC CAA CAT GGG CAC ATA AAC TCG TAT CTT AAA CCT ATG TTG CAG His Tyr Gln His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln 130 135 140	492
AGA GAT TTC ATA ACT GCT CTG CCA GCT CGG GGA TTG GAT CAT ATC GCT Arg Asp Phe Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala 145 150 155	540
GAG AAC ATT CTG TCA TAC CTG GAT GCC AAA TCA CTA TGT GCT GCT GAA Glu Asn Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu 160 165 170	588
CTT GTG TGC AAG GAA TGG TAC CGA GTG ACC TCT GAT GGC ATG CTG TGG Leu Val Cys Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp 175 180 185	636
AAG AAG CTT ATC GAG AGA ATG GTC AGG ACA GAT TCT CTG TGG AGA GGC Lys Lys Leu Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly 190 195 200 205	684
CTG GCA GAA CGA AGA GGA TGG GGA CAG TAT TTA TTC AAA AAC AAA CCT Leu Ala Glu Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro 210 215 220	732
CCT GAC GGG AAT GCT CCT CCC AAC TCT TTT TAT AGA GCA CTT TAT CCT Pro Asp Gly Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro 225 230 235	780
AAA ATT ATA CAA GAC ATT GAG ACA ATA GAA TCT AAT TGG AGA TGT GGA Lys Ile Ile Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly 240 245 250	828
AGA CAT AGT TTA CAG AGA ATT CAC TGC CGA AGT GAA ACA AGC AAA GGA Arg His Ser Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly 255 260 265	876
GTT TAC TGT TTA CAG TAT GAT GAT CAG AAA ATA GTA AGC GGC CTT CGA Val Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg 270 275 280 285	924
GAC AAC ACA ATC AAG ATC TGG GAT AAA AAC ACA TTG GAA TGC AAG CGA Asp Asn Thr Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg 290 295 300	972
ATT CTC ACA GGC CAT ACA GGT TCA GTC CTC TGT CTC CAG TAT GAT GAG Ile Leu Thr Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu 305 310 315	1020
AGA GTG ATC ATA ACA GGA TCA TCG GAT TCC ACG GTC AGA GTG TGG GAT Arg Val Ile Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp 320 325 330	1068

GTA AAT ACA GGT GAA ATG CTA AAC ACG TTG ATT CAC CAT TGT GAA GCA Val Asn Thr Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala 335 340 345	1116
GTT CTG CAC TTG CGT TTC AAT AAT GGC ATG ATG GTG ACC TGC TCC AAA Val Leu His Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys 350 355 360 365	1164
GAT CGT TCC ATT GCT GTA TGG GAT ATG GCC TCC CCA ACT GAC ATT ACC Asp Arg Ser Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr 370 375 380	1212
CTC CGG AGG GTG CTG GTC GGA CAC CGA GCT GCT GTC AAT GTT GTA GAC Leu Arg Arg Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp 385 390 395	1260
TTT GAT GAC AAG TAC ATT GTT TCT GCA TCT GGG GAT AGA ACT ATA AAG Phe Asp Asp Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys 400 405 410	1308
GTA TGG AAC ACA AGT ACT TGT GAA TTT GTA AGG ACC TTA AAT GGA CAC Val Trp Asn Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His 415 420 425	1356
AAA CGA GGC ATT GCC TGT TTG CAG TAC AGG GAC AGG CTG GTA GTG AGT Lys Arg Gly Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser 430 435 440 445	1404
GGC TCA TCT GAC AAC ACT ATC AGA TTA TGG GAC ATA GAA TGT GGT GCA Gly Ser Ser Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala 450 455 460	1452
TGT TTA CGA GTG TTA GAA GGC CAT GAG GAA TTG GTG CGT TGT ATT CGA Cys Leu Arg Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg 465 470 475	1500
TTT GAT AAC AAG AGG ATA GTC AGT GGG GCC TAT GAT GGA AAA ATT AAA Phe Asp Asn Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys 480 485 490	1548
GTG TGG GAT CTT GTG GCT GCT TTG GAC CCC CGT GCT CCT GCA GGG ACA Val Trp Asp Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr 495 500 505	1596
CTC TGT CTA CGG ACC CTT GTG GAG CAT TCC GGA AGA GTT TTT CGA CTA Leu Cys Leu Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu 510 515 520 525	1644
CAG TTT GAT GAA TTC CAG ATT GTC AGT AGT TCA CAT GAT GAC ACA ATC Gln Phe Asp Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser Ser His Asp Asp Thr Ile 530 535 540	1692
CTC ATC TGG GAC TTC CTA AAT GAT CCA GCT GCC CAA GCT GAA CCC CCC Leu Ile Trp Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro 545 550 555	1740
CGT TCC CCT TCT CGA ACA TAC ACC TAC ATC TCC AGA TAAATAACCA Arg Ser Pro Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg 560 565	1786
TACACTGACC TCATACTTGC CCAGGACCCA TTAAAGTTGC GGTATTTAAC GTATCTGCCA	1846
ATACCAGGAT GAGCAACAAC AGTAACAATC AAACACTGTC CCAGTTTCCC TGGACTAGCC	1906



GAGGAGCAGG GCTTTGAGAC TCCTGTTGGG ACACAGTTGG TCTGCAGTCG GCCCAGGACC 1966  
 GTCTACTCAG CACAACTGAC TGCTTCAGTG CTGCTATCAG AAGATGTCTT CTATCAATTG 2026  
 TGAATGATTG GAACTTTTAA ACCTCCCCTC CTCTCCTCCT TTCACCTCTG CACCTAGTTT 2086  
 TTTCCCATTTG GTTCCAGACA AAGGTGACTT ATAAATATAT TTAGTGTTTT GCCAGAAAAA 2146  
 AAAAAA 2151

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 569 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Asp Pro Ala Glu Ala Val Leu Gln Glu Lys Ala Leu Lys Phe Met  
 1 5 10 15  
 Asn Ser Ser Glu Arg Glu Asp Cys Asn Asn Gly Glu Pro Pro Arg Lys  
 20 25 30  
 Ile Ile Pro Glu Lys Asn Ser Leu Arg Gln Thr Tyr Asn Ser Cys Ala  
 35 40 45  
 Arg Leu Cys Leu Asn Gln Glu Thr Val Cys Leu Ala Ser Thr Ala Met  
 50 55 60  
 Lys Thr Glu Asn Cys Val Ala Lys Thr Lys Leu Ala Asn Gly Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Met Ile Val Pro Lys Gln Arg Lys Leu Ser Ala Ser Tyr Glu Lys  
 85 90 95  
 Glu Lys Glu Leu Cys Val Lys Tyr Phe Glu Gln Trp Ser Glu Ser Asp  
 100 105 110  
 Gln Val Glu Phe Val Glu His Leu Ile Ser Gln Met Cys His Tyr Gln  
 115 120 125  
 His Gly His Ile Asn Ser Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln Arg Asp Phe  
 130 135 140  
 Ile Thr Ala Leu Pro Ala Arg Gly Leu Asp His Ile Ala Glu Asn Ile  
 145 150 155 160  
 Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Lys Ser Leu Cys Ala Ala Glu Leu Val Cys  
 165 170 175  
 Lys Glu Trp Tyr Arg Val Thr Ser Asp Gly Met Leu Trp Lys Lys Leu  
 180 185 190  
 Ile Glu Arg Met Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly Leu Ala Glu  
 195 200 205  
 Arg Arg Gly Trp Gly Gln Tyr Leu Phe Lys Asn Lys Pro Pro Asp Gly  
 210 215 220

Asn Ala Pro Pro Asn Ser Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr Pro Lys Ile Ile  
 225 230 235 240  
 Gln Asp Ile Glu Thr Ile Glu Ser Asn Trp Arg Cys Gly Arg His Ser  
 245 250 255  
 Leu Gln Arg Ile His Cys Arg Ser Glu Thr Ser Lys Gly Val Tyr Cys  
 260 265 270  
 Leu Gln Tyr Asp Asp Gln Lys Ile Val Ser Gly Leu Arg Asp Asn Thr  
 275 280 285  
 Ile Lys Ile Trp Asp Lys Asn Thr Leu Glu Cys Lys Arg Ile Leu Thr  
 290 295 300  
 Gly His Thr Gly Ser Val Leu Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Arg Val Ile  
 305 310 315 320  
 Ile Thr Gly Ser Ser Asp Ser Thr Val Arg Val Trp Asp Val Asn Thr  
 325 330 335  
 Gly Glu Met Leu Asn Thr Leu Ile His His Cys Glu Ala Val Leu His  
 340 345 350  
 Leu Arg Phe Asn Asn Gly Met Met Val Thr Cys Ser Lys Asp Arg Ser  
 355 360 365  
 Ile Ala Val Trp Asp Met Ala Ser Pro Thr Asp Ile Thr Leu Arg Arg  
 370 375 380  
 Val Leu Val Gly His Arg Ala Ala Val Asn Val Val Asp Phe Asp Asp  
 385 390 395 400  
 Lys Tyr Ile Val Ser Ala Ser Gly Asp Arg Thr Ile Lys Val Trp Asn  
 405 410 415  
 Thr Ser Thr Cys Glu Phe Val Arg Thr Leu Asn Gly His Lys Arg Gly  
 420 425 430  
 Ile Ala Cys Leu Gln Tyr Arg Asp Arg Leu Val Val Ser Gly Ser Ser  
 435 440 445  
 Asp Asn Thr Ile Arg Leu Trp Asp Ile Glu Cys Gly Ala Cys Leu Arg  
 450 455 460  
 Val Leu Glu Gly His Glu Glu Leu Val Arg Cys Ile Arg Phe Asp Asn  
 465 470 475 480  
 Lys Arg Ile Val Ser Gly Ala Tyr Asp Gly Lys Ile Lys Val Trp Asp  
 485 490 495  
 Leu Val Ala Ala Leu Asp Pro Arg Ala Pro Ala Gly Thr Leu Cys Leu  
 500 505 510  
 Arg Thr Leu Val Glu His Ser Gly Arg Val Phe Arg Leu Gln Phe Asp  
 515 520 525  
 Glu Phe Gln Ile Val Ser Ser Ser His Asp Asp Thr Ile Leu Ile Trp  
 530 535 540  
 Asp Phe Leu Asn Asp Pro Ala Ala Gln Ala Glu Pro Pro Arg Ser Pro  
 545 550 555 560  
 Ser Arg Thr Tyr Thr Tyr Ile Ser Arg  
 565

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CCAAACTGCG TATAACGCG

19

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGTGAATCAA CGTGTTTAGC

20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGATGATGTA TATAACTATC

20

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

TTTATCCAG ATCTGATTG TGTTC

25

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CCAGGATCCT TATACAACAT TGACAGCAGC

30

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
  - (B) TYPE: nucléotide
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CCAGGATCCT TAGTCCCAGA TGAGGATTG

29

## REVENDICATIONS

1. Protéine humaine  $\beta$ TrCP (h- $\beta$ TrCP) de ciblage des protéines vers les  
5 voies de dégradation par le protéasome, caractérisée en ce qu'elle a la  
SEQ ID No.2.

2. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est capable  
d'interagir avec les protéines susceptibles d'être dégradées par le protéasome,  
notamment celles qui possèdent le motif d'acides aminés Asp-Ser-Glu-Xaa-Xaa-  
10 Ser dans lequel Xaa est un acide aminé naturel quelconque.

3. Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle  
est capable d'interagir avec la protéine Vpu du virus HIV-1 ou avec les protéines  
cellulaires I $\kappa$ B ou  $\beta$ -caténine.

4. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est capable  
15 d'interagir avec la protéine Skp1p.

5. Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en  
ce qu'elle comporte les motifs ci-après :

- boîte F : acides aminés 147-191,
- premier motif WD : acides aminés 259-292,
- 20 - deuxième motif WD : acides aminés 304-332,
- troisième motif WD : acides aminés 343-372,
- quatrième motif WD : acides aminés 387-415,
- cinquième motif WD : acides aminés 427-455,
- sixième motif WD : acides aminés 467-492,
- 25 - septième motif WD : acides aminés 516-544.

6. Fragments peptidiques de la protéine selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 5 résultant de l'addition, la suppression et/ou le remplacement  
d'un ou plusieurs acides aminés, lesdits fragments peptidiques ayant conservé  
l'activité d'interaction avec la protéine Vpu du virus HIV-1, la protéine cellulaire  
30 I $\kappa$ B ou la protéine cellulaire  $\beta$ -caténine et/ou avec la protéine Skp1p.

7. Séquences d'acides nucléiques codant pour la protéine humaine h-βTrcp et les fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce qu'elles sont constituées par :

- a) la séquence d'ADN SEQ ID No.1 et des fragments d'acides nucléiques codant  
5 pour lesdits fragments peptidiques ;
- b) les séquences d'ADN hybridant dans des conditions strictes avec les séquences ci-dessus ou un de ses fragments ;
- c) les séquences d'ADN qui, en raison de la dégénérescence du code génétique, résultent des séquences a) et b) ci-dessus et codent pour la protéine humaine  
10 h-βTrcp ou les fragments de celle-ci ; et
- d) les séquences d'ARNm et d'ADN correspondantes.

8. Utilisation de la protéine h-βTrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h-βTrCP et la  
15 protéine Vpu.

9. Utilisation de la protéine h-βTrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV-1 susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h-βTrCP et la protéine Skp1p.

20 10. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV susceptibles d'inhiber l'interaction entre la protéine h-βTrCP et la protéine Vpu.

11. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents antiviraux anti-HIV susceptibles d'inhiber l'interaction  
25 entre la protéine h-βTrCP et la protéine Skp1p.

12. Utilisation de la protéine h-βTrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par inhibition ou  
30 activation de l'interaction entre la protéine h-βTrCP et la protéine Skp1p.

13. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7, pour le criblage d'agents antitumoraux capables de perturber la régulation du cycle cellulaire ou des processus de dégradation des protéines dans des cellules humaines tumorales par inhibition ou activation de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine Skp1p.

14. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents anti-inflammatoires capables de perturber l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine I $\kappa$ B.

15 15. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents anti-inflammatoires capables de perturber l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine I $\kappa$ B.

16. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents antitumoraux susceptibles de réactiver l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et une protéine  $\beta$ -caténine mutée de cellules tumorales, ou entre la h- $\beta$ TrCP et la  $\beta$ -caténine normale de cellules tumorales dépourvues de la protéine APC.

20 17. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents antitumoraux susceptibles de réactiver l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ -caténine mutée de cellules tumorales ou entre la h- $\beta$ TrCP et la  $\beta$ -caténine normale de cellules tumorales dépourvues de la protéine APC.

25 18. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour le criblage d'agents anti-Alzheimer susceptibles de réduire le taux de la  $\beta$ -caténine par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ -caténine.

19. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour le criblage d'agents anti-Alzheimer susceptibles de réduire le taux de la  $\beta$ -caténine par inhibition de l'interaction entre la protéine h- $\beta$ TrCP et la protéine  $\beta$ -caténine.

5        20. Utilisation de la protéine h- $\beta$ TrCP ou des fragments peptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour la détection par criblage en double-hybride en levure des mutations de la  $\beta$ -caténine.

21. Utilisation des séquences d'acides nucléiques selon la revendication 7 pour la détection par criblage en double-hybride en levure des mutations de la  $\beta$ -  
10 caténine.

22. Agents antiviraux anti-HIV qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 4 dénués de la boîte F.

23. Agents antiviraux anti-HIV qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 7 dénués des motifs  
15 WD.

24. Anticorps dirigés contre la protéine h- $\beta$ TrCP ou les fragments peptidiques tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 6.

25. Oligonucléotides antisens bloquant la transcription ou la traduction de la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 qui s'hybrident  
20 avec une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 7.

26. Agents antitumoraux qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 7, qui possèdent la boîte F.

27. Agents antitumoraux qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 7 et qui ont conservé à la fois les  
25 motifs WD et la boîte F.

28. Agents anti-inflammatoires qui sont constitués par les fragments peptidiques de la protéine h- $\beta$ TrCP selon la revendication 7 dénués de la boîte F.

29. Animaux transgéniques exprimant un transgène de la protéine h- $\beta$ TrCP selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

30        30. Animaux transgéniques dans lesquels le gène  $\beta$ TrCP a été invalidé.



31. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 7 et les moyens nécessaires à son expression.

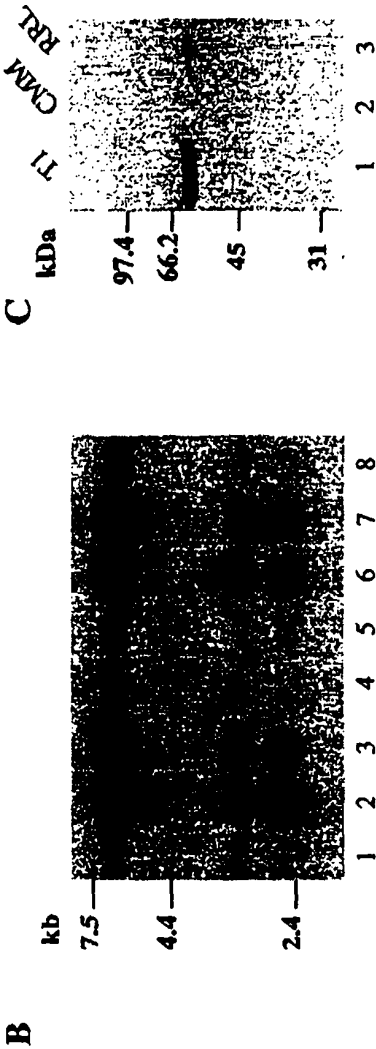
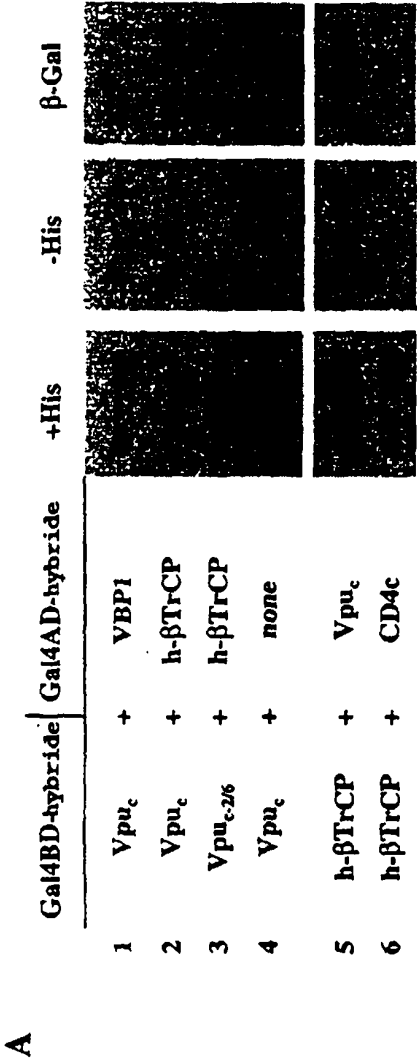
5 32. Microorganismes ou cellules hôtes transformés par un vecteur d'expression selon la revendication 31.

33. Microorganismes ou cellules hôtes co-transformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine Vpu et un vecteur d'expression selon la revendication 31.

10 34. Microorganismes ou cellules hôtes cotransformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine Skp1p et un vecteur d'expression selon la revendication 31.

35. Microorganismes ou cellules hôtes cotransformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine I $\kappa$ B et un vecteur d'expression selon la revendication 31.

15 36. Microorganismes ou cellules hôtes cotransformés par un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine  $\beta$ -caténine oncogène et un vecteur d'expression selon la revendication 31.



*****	*****	*****	33
OPAEAVLOEKALPMN	SSERPCNNGEPFRI		28
SGPSCSLQPPPT	ASERPCNNDPFPRI		60
RRRQRQMSFEDKDDLDNSNSNSSEMTDTAMPPPLKLLITGSSDLAGGSSGCK			40
SSVLMSTVTPFLREHPSIYAPIGKPGNQETARAENPN			
*****	*****	*****	88
PEKNSLRQTYNSCARLCLNQETVCLASTAMKTENCVAKTKLANGTSMIVPKCR			53
ITE	KNTLRQTKLANGTSMIVPKCR		120
ITMATRSPSSPDLATNDSGTRVQPLPEYNFTKFCYRNNDIQFSPHTTACYGDLKRTQ			63
	SKYCYRHHPD	SKCRAADKAKMV	
*****	*****	*****	126
ELSGYERKEKLCVKYFEQWSESDVEEVEELISBYCH			91
ELSGYERKEKLCVKYFEQWSECDVEEVEELISBYCH			178
EINANIAKLPLQBSDIHHIISYNSNDIRKCLLDGILSTCFPLSTYISSYTH			121
MIQSELDKLTSAOQAVTHVWSLFSAPARHDLLOGILSOLCFPLSUSREVNEA			
*****	*****	*****	186
YQHGHSYLYKPMQRODPTALPARGLDHIAENILSYLDAKSLGANELVOKDXYVTSOG			151
YQHGHSINTLYKPMQRODPTALPARGLDHIAENILSYLDAKSLGANELVOKDXYVTSOG			221
IKIDFISILPQE	LSLKILSYLDCOGLONATRVORAKKLADDO		164
IKIDFISADIVE	LAQKVLVLDVSLTKAACSSORARTLADSD		
*****	*****	*****	245
MLAKKILIRMTDLSWRGLAERRNGOYLFKPKPPDGNAPPNSFYRALYPKIQDIET			210
MLAKKILIRMTDLSWRGLAERRNGOYLFKPKPPDGKTTPNSFYRALYPKIQDIET			270
RVYEMCSOHI	DRKCPNCGCLPLLMK	RARIOQNFSGSSNADIQTOT	218
AVGVKCSOHU	YRKCTKCSGLPLERKLRNYTROROLAKGGPQGRVTELADS		
*****	*****	*****	248
		TRPNKVIYRERFKVES	213
HDSQDRSVNQHGRPAAEAEEDPIKKRQMAAAEASKAVTQPKTRSNKAVYDRNOVSY			286
			278
*****	*****	*****	308
NWPCPHSLQRIHCRSTTSKGYVLCDDQKIVSGLRNTIKIWDONILEQKRIHCRHTG			273
NWPCPHSLQRIHCRSTTSKGYVLCDDQKIVSGLRNTIKIWDONILEQKRIHCRHTG			343
NWPCPHSLQRIHCRSTTSKGYVLCDDQKIVSGLRNTIKIWDONILEQKRIHCRHTG			335
*****	*****	*****	368
SWLCLQYSEFVLTGSSSTVRVQVNEGEENTLIHCRVHLRNGMAVTCCKRS			333
SWLCLQYSEFVLTGSSSTVRVQVNEGEENTLIHCRVHLRNGMAVTCCKRS			403
GUKTLYSDRKLITGSLKIRVAYITGECISTYRSHSDVLSVDSYQKVINSGSADKT			395
GIRACQDSKLTSGSLHETVYVNHITGECSIFAARTDSNISVBSGHLASGSSDKT			
*****	*****	*****	427
IAVYDMASTDIILRVLVGHRAAVNVVFDDKYIVSASGRTIKVNTSTCEFVRLN			392
IAVYDMASTDIILRVLVGHRAAVNVVFDDKYIVSASGRTIKVNTSTCEFVRLN			461
VKIFPNSKETYCLHSDVNVSTH	WEIKSRTVFSASDGTIKLCLDROVITTEG		453
*****	*****	*****	427
HVGQVQKIIPLTIKQVE	NLATDNTSDG		488
HVGHVQVQLILPPEYEPDEEVLNGASQDNQDAMSVSSSGSGSPMSHAQIERAGSPGSHS			513
*****	*****	*****	465
CHKRGIACTQYRDLVVSGSSDHTIRLWDECCACLRV			430
CHKRGIACTQYRDLVVSGSSDHTIRLWDECCACLRV			547
SSPQDDPTMTDGADESSTPSNEQETVLDENIPPTHLLSCOLDLWLVKTKCLPT			573
SSHMLLPSSLPSGDEVRHLYGSAPVADESRLPPVFNCGLESFRLWDSATGCLPT			
*****	*****	*****	525
LEGHEFLVRCIRFDMKRIYSGAYDCKIKVWDLVAALDPRAPAGTLCLETVEHSGRVFRL			490
LEGHEFLVRCIRFDMKRIYSGAYDCKIKVWDLVAALDPRAPAGTLCLETVEHSGRVFRL			607
QFGEHVFQWDAADNFRITSGHDCSIKVWDLQSGRCMTFNGRRLQRETOHTQTQSLGD			619
LEGHEFLVRCIRFDMKRIYSGAYDCKIKVWDLVAALDPRAPAGTLCLETVEHSGRVFRL			
*****	*****	*****	569
QFDEFQIVSSSHDDTILWDLNDPAAQAEPPRSPSRITYYISR		h-BTrCP	518
QFDEFQIVSSSHDDTILWDLNDPGLA		x-BTrCP1	640
KVAPIACVIGDSACFSGDEGCVKMYKFDLND		MET30	650
---PVTCGLSGLMASGSGDGTIRLHSHFKPCRQ		SCON2	



Figure 3













	LexA-hybride	Gal4AD-hybride	+His	-His	$\beta$ -gal	$\beta$ -Galunités
1	Skp1p	+ h- $\beta$ TrCP				18
2	Skp1p	+ h- $\beta$ TrCP- $\Delta$ 7W				124
3	Skp1p	+ VBP1				2
4	Skp1p	+ CD4c				2

Figure 4

Compartement luminal

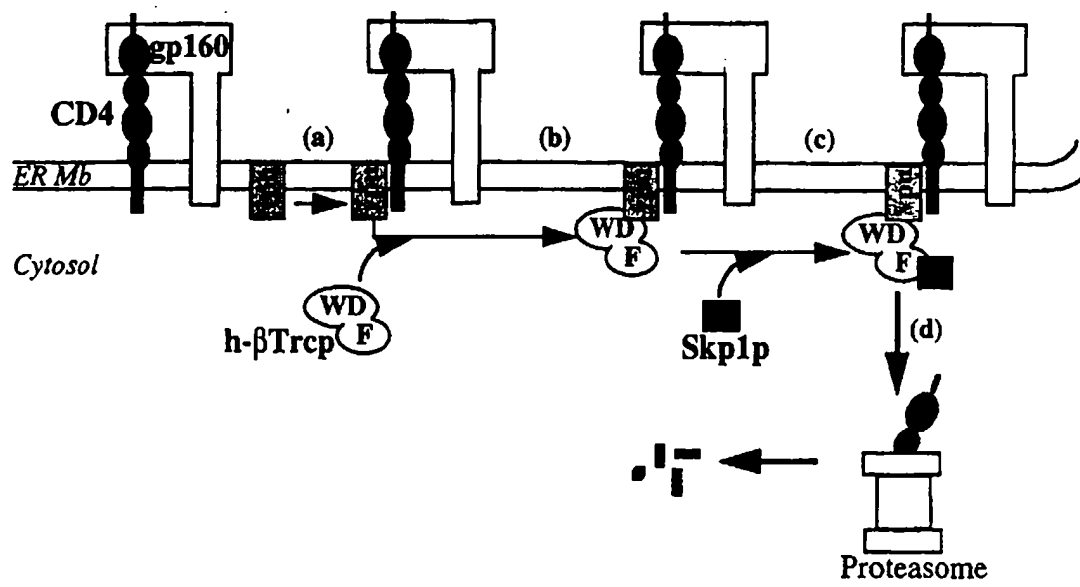


Figure 5

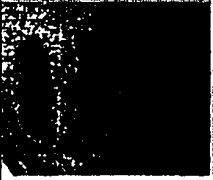





LexA BD	Gal4 AD	+His	-His	$\beta$ -Gal
$\beta$ TrCP	I $\kappa$ B $\alpha$			
$\beta$ TrCP	I $\kappa$ B $\alpha$ S32-36A			
$\beta$ TrCP	Raf			
Ras	I $\kappa$ B $\alpha$			
$\beta$ TrCP	Vpu <sub>c</sub>			
Ras	Raf			

Figure 6

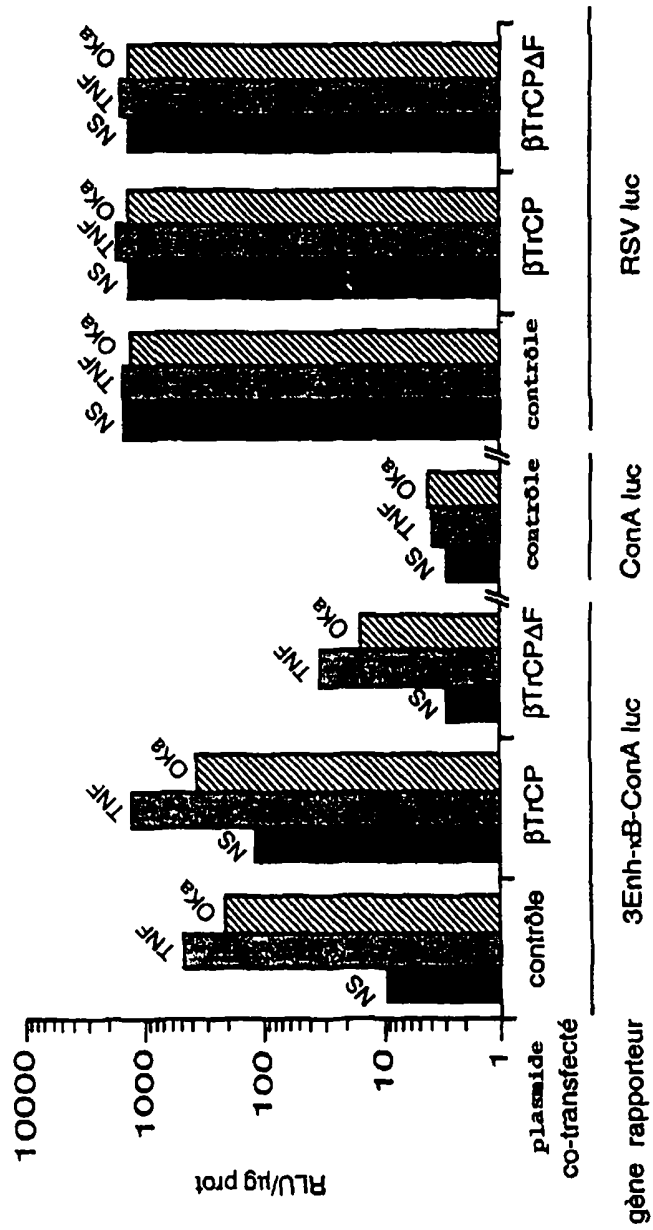


Figure 7



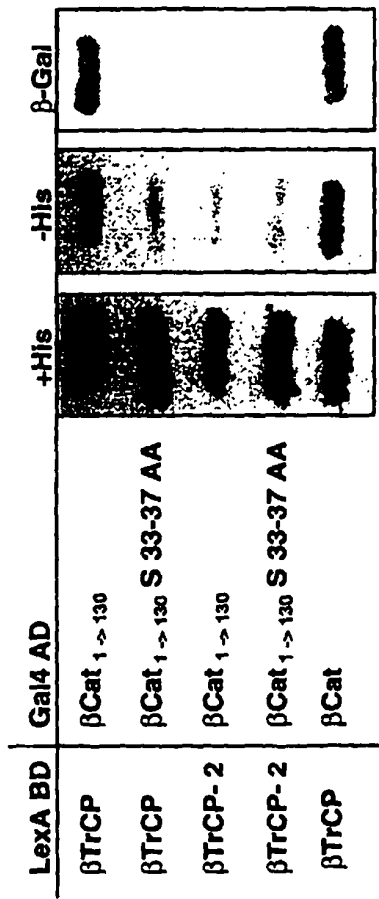


Figure 8

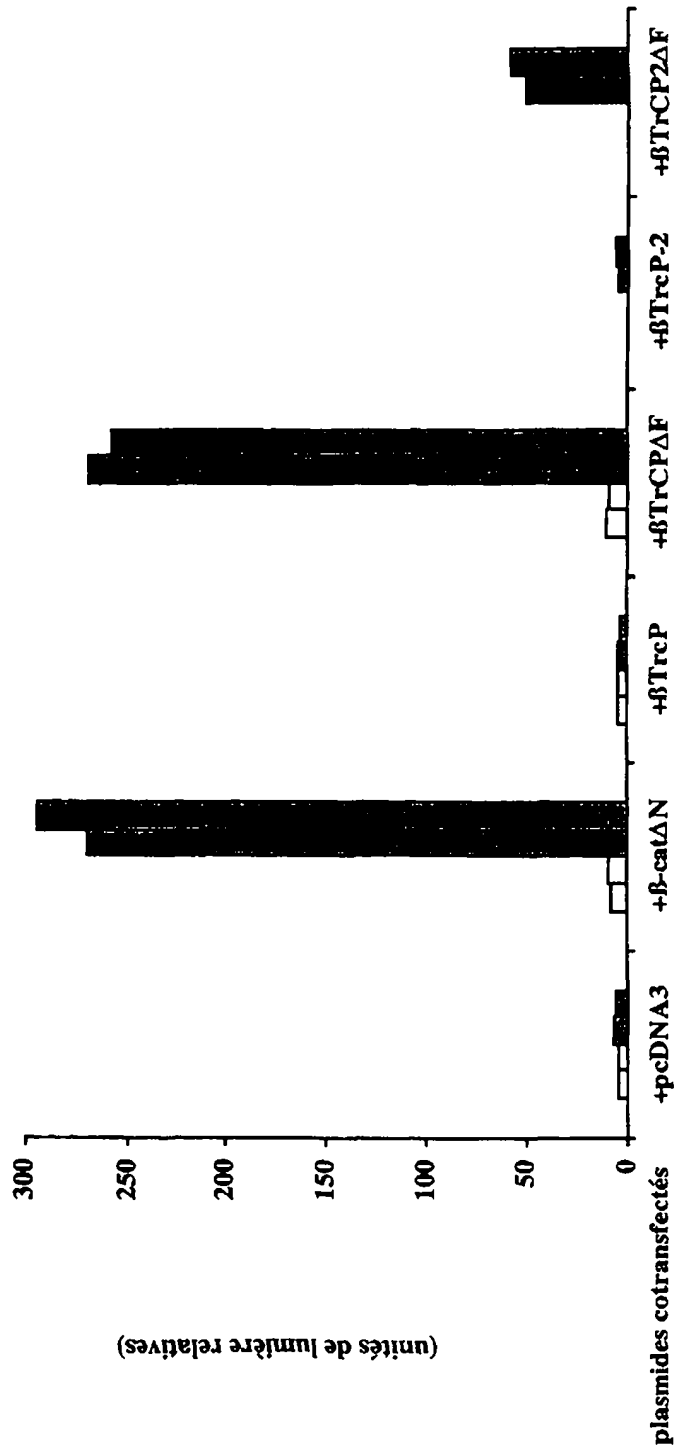


Figure 9

plasmides rapporteurs : en gris, TOP-tk-Luci ; en blanc, FOP-tk-Luci